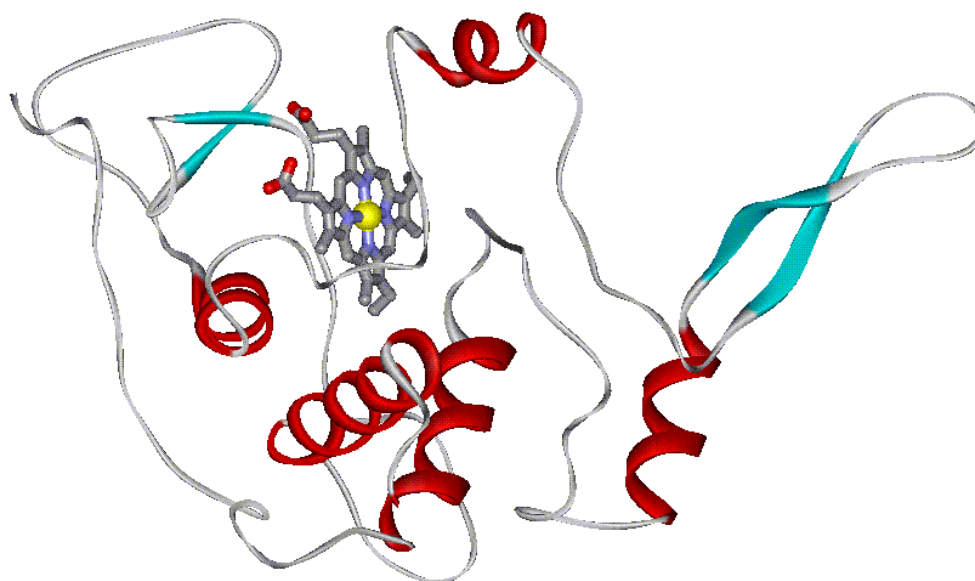


Konstruktion und funktionelle Charakterisierung löslicher Fragmente des Cytochrom c_1 aus *Paracoccus denitrificans*

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main



von
Anna Carina Eichhorn
aus Frankfurt

Franfurt am Main, 2003
(DF1)

Vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. W. E. Müller

Gutachter: Prof. Dr. B. Ludwig
Prof. Dr. W. Mäntele

Datum der Disputation:

for little one

1. Einleitung	1
1.1 Die Atmungskette	1
1.1.1 Die mitochondriale Atmungskette	1
1.1.2 Die prokaryotische Atmungskette	2
1.2 Das Bodenbakterium <i>Paracoccus denitrificans</i>	3
1.2.1 Der Elektronentransport in <i>P. denitrificans</i>	3
1.2.2 Der <i>bc₁</i> Komplex aus <i>P. denitrificans</i>	5
1.2.3 Das Cytochrom <i>c₅₅₂</i> aus <i>P. denitrificans</i>	8
1.2.4 Das Cytochrom <i>c₅₅₀</i> aus <i>P. denitrificans</i>	10
1.3 Untersuchungen am Cytochrome <i>c₁</i> aus <i>Paracoccus denitrificans</i>	10
1.4 Zielsetzung	12
2. Material	13
2.1 Chemikalien	13
2.2 Biochemikalien	13
2.3 Kits	13
2.4 Plasmide	14
2.4.1 Übersicht verwendete Plasmide	14
2.4.2 Übersicht hergestellte Plasmide	15
2.5 Primer	15
2.5.1 Primer für die Fragmentkonstruktion	15
2.5.2 Sequenzierprimer	16
2.5.3 Mutageneseprimer	16

2.6 Stämme	17
2.6.1 Übersicht verwendete Stämme	17
2.6.1.1 <i>E. coli</i>	17
2.6.1.2 <i>P. denitrificans</i>	18
2.6.2 Übersicht hergestellte Stämme	18
2.7 Lösungen	21
2.7.1 Medien	21
2.7.1.1 <i>LB-Medium</i>	21
2.7.1.2 <i>TY-Medium</i>	21
2.7.1.3 <i>M9-Medium (Minimal-Medium)</i>	21
2.7.1.4 <i>Succinat-Medium</i>	22
2.7.2 Antibiotika	23
3. Methoden	24
3.1 Molekulargenetische Methoden	24
3.1.0 Kultivierung von Mikroorganismen	24
3.1.1 Minipräp (Plasmidpräparation)	24
3.1.2 Restriktion	25
3.1.3 Ligation und Transformation	25
3.1.4 Herstellung chemisch kompetenter Zellen	26
3.1.5 Konjugation	27
3.1.6 Agarosegel-Elektrophorese	28
3.1.7 DNA Extraktion aus Agarosegelen	29
3.1.7.1 <i>Phenol Crush Methode</i>	29
3.1.7.2 <i>QIAquick PCR Purification Methode</i>	29

3.1.8 PCR	29
3.1.9 Präparation von Einzelstrang DNA	31
3.1.10 Mutagenese	32
3.1.11 Sequenzierung	32
3.1.11.1 Radioaktive Sequenzierung	32
3.1.11.2 Fluoreszenz-markierte Sequenzierung	33
3.2 Proteinbiochemische Methoden	34
3.2.1 Homologe Expression von Cytochrom <i>bc₁</i> in <i>P. denitrificans</i>	34
3.2.2 Heterologe Expression von löslichen Cytochromen aus <i>P. denitrificans</i> in <i>E. coli</i>	34
3.2.2.1 Expression von löslichen Konstrukten des Cytochrom <i>c₁</i>	34
3.2.2.2 Heterologe Expression des löslichen Konstruktes von Cyt <i>c₅₅₂</i>	38
3.2.2.3 Heterologe Expression des Cytochrom <i>c₅₅₀</i>	38
3.2.3 Periplasmapräparation	38
3.2.4 SDS PAGE nach Laemmli und Schägger	39
3.2.5 Western Blot	39
3.2.6 Hämfärbung	40
3.2.7 Säulen-Chromatographie	41
3.2.7.1 Säule 1: Anionenaustauscher (<i>Q-Sepharose Fast Flow</i>)	41
3.2.7.2 Säule 2: Gelfiltration (<i>Sephacryl-200</i>)	42
3.2.7.3 Säule 3: Anionenaustauscher (<i>DEAE Sepharose CL-6B</i>)	42
3.3 Analytische Methoden	43
3.3.1 Redox-Differenzspektren	43
3.3.2 <i>steady-state</i> -Kinetiken	43
3.3.3 Doppelsektor-Küvetten-Experimente	44

3.3.4 pre- <i>steady-state</i> -Kinetiken	45
3.3.5 Differentielle Scanning Kalorimetrie	46
4. Ergebnisse	47
4.1 Expression und Aufreinigung	47
4.1.1 Konstruktion von pET-Cyt c_1 -KF und pET-Cyt c_1 -SF	47
4.1.2 Konstruktion von pAlter-Cyt c_1 -KF	49
4.1.3 Konstruktion von pEC-Kan ^R	50
4.1.4 Konstruktion von pET-Cyt c_{550}	52
4.1.5 Mutagenese	52
4.1.6 Homologe Expression von bc_1 ($\Delta acid_fbc$) in <i>P. denitrificans</i>	56
4.1.7 Heterologe Expression von <i>P. denitrificans</i> Cytochrom c_1 in <i>E. coli</i>	56
4.1.8 Aufreinigung der löslichen Konstrukte des Cytochrom c_1 (KF/SF)	59
4.1.8.1 Aufreinigung des Kernfragments von Cytochrom c_1	59
4.1.8.2 Aufreinigung des sauren Fragments von Cytochrom c_1	61
4.1.9 Heterologe Expression von <i>P. denitrificans</i> Cyt c_{550} in <i>E. coli</i>	61
4.1.10 Aufreinigung des Cytochrom c_{550}	62
4.2 Funktionelle Charakterisierung	63
4.2.1 Untersuchungen im <i>steady-state</i> -Bereich	63
4.2.2 Untersuchungen im pre- <i>steady-state</i> -Bereich	64
4.2.3 Ionenstärkeabhängigkeit	75
4.2.4 Analytische Gelfiltration des Komplexes aus Cyt c_1 KF und Cyt c_{552}	89
4.2.5 Analytische Ultrazentrifugation des Komplexes aus Cyt c_1 KF und Cyt c_{552}	90
4.2.6 Thermostabilität des Kernfragments	92

4.2.7	Homonukleare NMR Messungen	94
4.2.8	Redox titrationen	95
4.2.9	Kinetische Untersuchungen an Mutanten des Cytochrom c_1 Kernfragments	97
5.	Diskussion	102
5.1	Expression und Aufreinigung	102
5.1.1	Konstruktion und Expression löslicher Fragmente des Cytochrom c_1 aus <i>Paracoccus denitrificans</i>	103
5.1.1.1	<i>Konstruktion und Klonierung der Fragmente</i>	103
5.1.1.2	<i>Heterologe Expression in E. coli</i>	103
5.1.1.3	<i>Mutagenese</i>	106
5.1.2	Konstruktion und Expression des Cytochrom c_{550} aus <i>P. denitrificans</i>	107
5.1.3	Aufreinigung der löslicher Cytochrome [c_1 (KF/SF) und c_{550}]	107
5.2	Funktionelle Charakterisierung	109
5.2.1	<i>steady-state</i> Kinetiken	109
5.2.2	<i>pre- steady-state</i> Kinetiken	109
5.2.2.1	<i>Ionenstärkeabhängigkeit</i>	115
5.2.2.2	<i>Spezifität von SF und KF gegenüber Cytochrom c_{552}</i>	118
5.2.3	Untersuchungen zur Bildung eines Komplexes aus Cyt c_1 /Cyt c_{552}	121
5.2.4	Untersuchungen zur Thermostabilität des Kernfragmentes	122
5.2.5	Kinetische Untersuchungen an Mutanten des Cytochrom c_1 Kernfragments	122
6.	Zusammenfassung	130
7.	Literaturverzeichnis	132

8. Abkürzungen	143
9. Danksagung	145
10. Lebenslauf	148

1. Einleitung

1.1 Die Atmungskette

Die Hydrolyse der Phosphorsäureanhydrid-Bindung des Adenosintriphosphat (ATP) stellt die wichtigste Energiequelle der endergonischen Abläufe in Zellen aller Organismen dar. In aeroben Organismen, von Bakterien bis hin zu den Säugetieren, werden 90 % des ATPs durch die Atmungskette und die mit ihr verknüpfte ADP-Phosphorylierung erzeugt (von Jagow und Engel, 1980). Die Atmungskette besteht aus einer Elektronentransportkette und einer ATP-Synthase. Die im Zuge der Oxidation von Nährstoffen reduzierten Reduktionsäquivalente FADH_2 und NADH werden über die Atmungskette reoxidiert. Die Elektronen werden hierbei unter der Bildung von H_2O auf Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor übertragen. Die große Differenz der Normalpotentiale von NADH/NAD^+ (- 0.32 V) zu $\text{H}_2\text{O/O}_2$ (+ 0.81 V) wird genutzt, um die durch die Enzyme der Atmungskette katalysierte Kaskade gekoppelter Redoxreaktionen anzutreiben. Nach der chemiosmotischen Theorie (Mitchell, 1961; Darnell *et al.*, 1994; Prebble, 1996) dient die bei diesem Prozess freiwerdende Energie primär zum Aufbau eines elektrochemischen Protonengradienten ($\Delta\mu_{\text{H}^+}$). Dieses elektrochemische Potential wird zur Phosphorylierung von ADP durch die ATP-Synthase genutzt.

1.1.1 Die mitochondriale Atmungskette

Die Komplexe der eukaryotischen Atmungskette sind in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert. Das in verschiedenen Stoffwechselwegen gewonnene Reduktionsäquivalent NADH wird an Komplex I ($\text{NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase}$) zu NAD^+ reoxidiert. Die Elektronen werden daraufhin auf ein in der Membran lösliches Ubichinon (CoQ) übertragen, welches ebenfalls von Komplex II ($\text{Succinat:Ubichinon-Oxidoreduktase}$; oxidiert FADH_2 aus dem Citratcyclus) reduziert werden kann. CoQ überträgt die Elektronen wiederum auf Komplex III ($\text{Ubichinon:Cytochrom-}c\text{-Oxidoreduktase}$; bc_1 -Komplex). Dieser reduziert das lösliche Cytochrom c , welches als Elektronenmediator zwischen Cytochrom bc_1 und Komplex IV ($\text{Cytochrom-}c\text{-Oxidase}$) fungiert. Die Cytochrom- c -Oxidase (COX) katalysiert die Übertragung der Elektronen auf

molekularen Sauerstoff. Der Elektronentransport über die Komplexe I, III und IV ist an eine Translokation von Protonen über die Membran gekoppelt und trägt somit zum Aufbau eines Protonengradienten und des Membranpotentials bei, die gemeinsam den elektrochemischen Potentialgradienten bilden. Dieser wiederum kann gemäß der chemiosmotischen Theorie (Mitchell, 1961; Darnell *et al.*, 1994; Prebble, 1996) zur ATP-Synthese aus ADP und P_i genutzt werden.

Die Komplexe der mitochondrialen Atmungskette sind in folgender Abbildung schematisch dargestellt.

Zwischenmembranraum

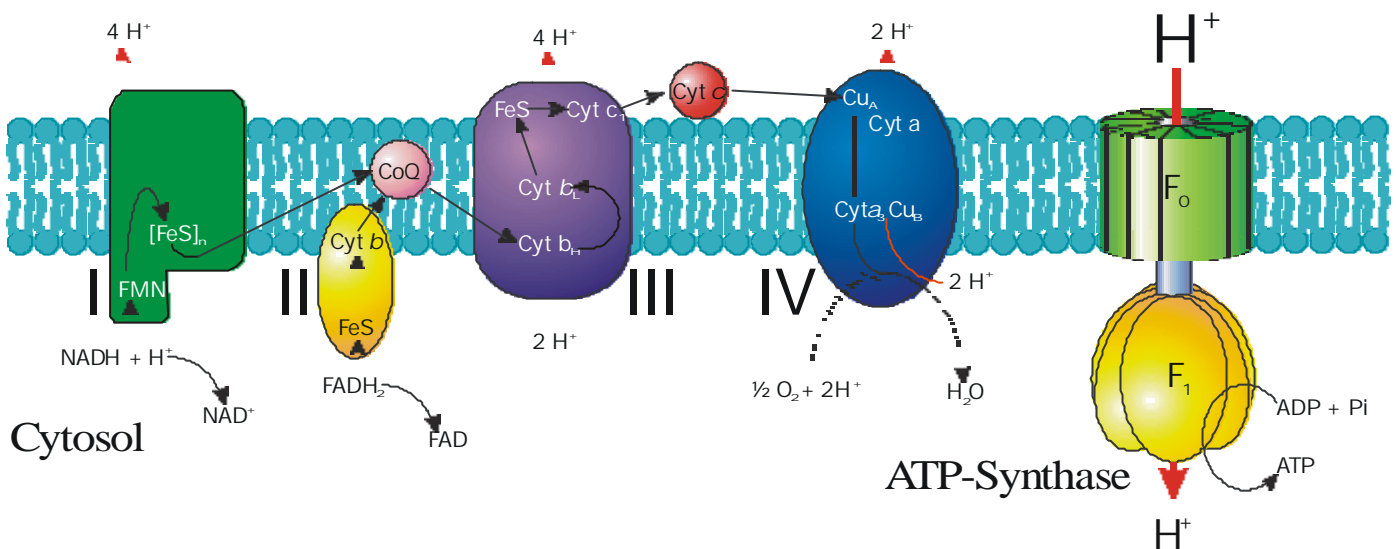


Abbildung 1.1: Grafische Darstellung der Enzyme der mitochondrialen Atmungskette.

1.1.2 Die prokaryotische Atmungskette

Die Enzyme der Atmungskette sind bei Bakterien in der Cytoplasmamembran lokalisiert. Die Untereinheitenstruktur bakterieller Atmungskettenenzyme ist weitaus einfacher als die mitochondrialer Proteine. Aus diesem Grund werden bakterielle Systeme häufig als Untersuchungsmodelle respiratorischer Prozesse herangezogen. Zudem bieten prokaryotische Systeme den Vorteil, dass sie sich einfacher auf genetischer Ebene verändern lassen. Trotz des einfacheren Aufbaus bakterieller Atmungskettenenzymkomplexe verfügen Prokaryoten meist über sehr viel komplexere Elektronentransferwege als mitochondriale Systeme (Anthony, 1988). Die meisten Bakterien verfügen über weit verzweigte Elektronentransportketten, die ihnen eine Anpassung an unterschiedliche

Wachstumsbedingungen ermöglichen. Ein breites Spektrum an terminalen Oxidasen lässt hierbei auf verschiedene aerobe und anaerobe Elektronentransportwege schließen.

1.2 Das Bodenbakterium *Paracoccus denitrificans*

Das gram-negative Bodenbakterium *Paracoccus denitrificans* aus der α_3 -Untergruppe der Purpurbakterien (Woese, 1987) besitzt eine stark verzweigte Elektronentransportkette, welche dem Mikroorganismus eine Anpassung an unterschiedliche Wachstumsbedingungen ermöglicht. Das unbewegliche, coccoide Bakterium kann heterotroph mit einer Reihe verschiedener Kohlenstoffquellen wachsen (Stouthamer, 1980; Nokhal und Schlegel, 1983). Das Wachstum kann hierbei sowohl unter aeroben Bedingungen als auch unter anaeroben Bedingungen mit Nitrat, Nitrit, NO und N₂O als terminalem Elektronenakzeptor erfolgen (Haddock und Jones, 1977; van Verseveld, 1983; Stouthamer, 1991). Die aerobe Atmungskette von *P. denitrificans* weist große Ähnlichkeiten zu mitochondrialen Elektronentransportketten auf, weswegen das Bakterium im Zuge der Endosymbiontenhypothese (John und Whatley, 1975) auch als Vorläufer der eukaryotischen Mitochondrien angesehen wird. Aufgrund seiner metabolischen Flexibilität und wegen der großen physiologischen Ähnlichkeit mit den Mitochondrien eukaryotischer Zellen ist das Bakterium *P. denitrificans* als Modellorganismus in den Mittelpunkt der Forschung gerückt.

1.2.1 Der Elektronentransport in *Paracoccus denitrificans*

Die Anpassungsfähigkeit von *P. denitrificans* an verschiedene Umweltbedingungen drückt sich in einer sehr komplexen und stark verzweigten Atmungskette aus. Die Zusammensetzung der Atmungskette variiert zudem mit den jeweiligen Wachstumsbedingungen (van Spanning *et al.*, 1995).

Unter aeroben Bedingungen ähnelt die Elektronentransportkette den Komplexen der mitochondrialen Atmung. Die Elektronen werden durch ein in der Membran bewegliches Ubichinon von der NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase zum *bc*₁-Komplex transportiert. Von Komplex III werden die Elektronen über ein membranständiges Cytochrom *c*₅₅₂ auf die terminale Cytochrom-*c*-Oxidase des *aa*₃-Typs übertragen (Ludwig und Schatz, 1980; Haltia *et al.*, 1988). *P. denitrificans* verfügt zudem noch über zwei weitere, alternative

terminale Häm-Kupfer-Oxidasen, die je nach Wachstumsbedingungen unterschiedlich stark exprimiert werden. Ist der Sauerstoffpartialdruck sehr gering so wird die *cbb₃*-Oxidase bevorzugt exprimiert (Bosma *et al.*, 1987; de Gier *et al.*, 1994). Die Chinol-Oxidase vom *ba₃*-Typ (Ludwig, 1992) dient der direkten Oxidation von Ubichinol durch molekularen Sauerstoff und umgeht somit Komplex III (Richter *et al.*, 1994). Analog zu der mitochondrialen Cytochrom-*c*-Oxidase ist bei allen drei terminalen Oxidasen der Elektronentransport an die Translokation von Protonen über die Membran gekoppelt. Die Chinol-Oxidase vom *ba₃*-Typ dient unter semianaeroben Bedingungen als Elektronen-Endakzeptor und erhält die Elektronen direkt vom Ubichinol. Unter aeroben Bedingungen kommt der *aa₃*-Cytochrom-*c*-Oxidase die größte Bedeutung zu. Die *cbb₃*-Oxidase, auch alternative Cytochrom-*c*-Oxidase genannt, hat eine im Vergleich zur *aa₃*-Oxidase wesentlich erhöhte Affinität zu Sauerstoff ($K_M = 7 \text{ nM}$) und bietet daher auch bei sehr niedrigem Sauerstoffpartialdruck einen weiteren Parallelweg des Elektronentransportes (Baker *et al.*, 1998).

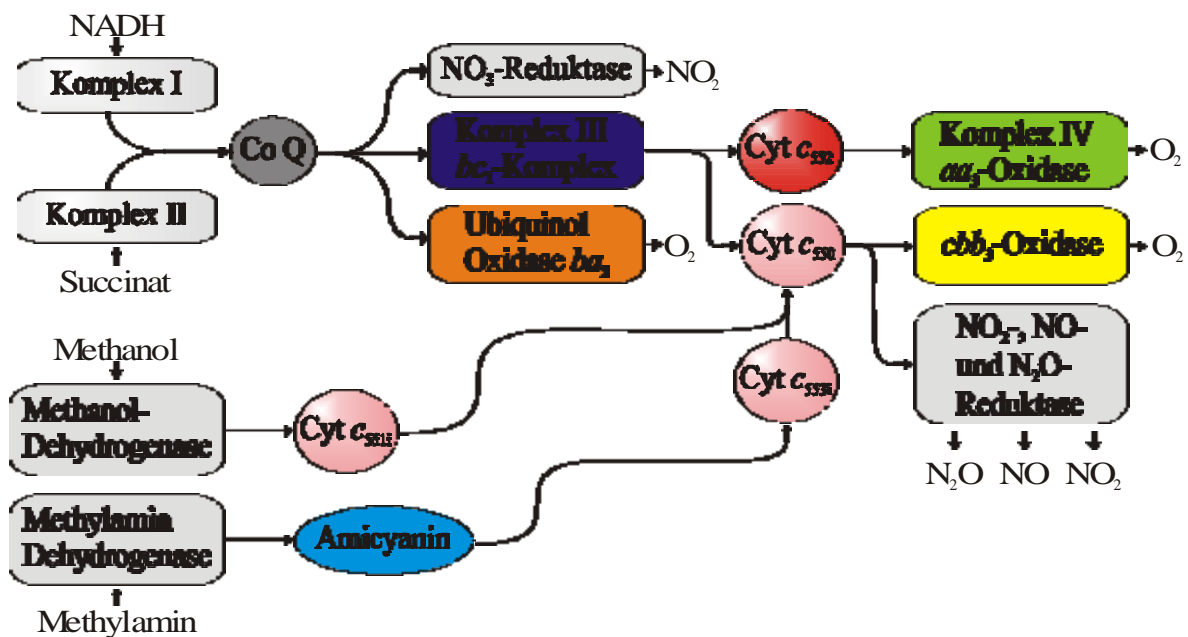


Abbildung 1.2: Die verzweigte Atmungskette von *P. denitrificans*. Gezeigt sind aerobe und anaerobe Elektronentransportwege. Zur Protonentranslokation sind Komplex I (NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase), Komplex III (*bc₁*-Komplex) und die terminalen Oxidasen (*aa₃*-Oxidase und *cbb₃*-Oxidase) befähigt.

1.2.2 Der bc_1 -Komplex aus *P. denitrificans*

Im Vergleich zu mitochondrialen bc_1 -Komplexen, die bis zu elf unterschiedliche Untereinheiten besitzen können, ist das Enzym aus *P. denitrificans* vergleichsweise einfach aufgebaut. Nur drei Untereinheiten, die die vier erwähnten redoxaktiven Metallzentren tragen, bilden den Komplex.

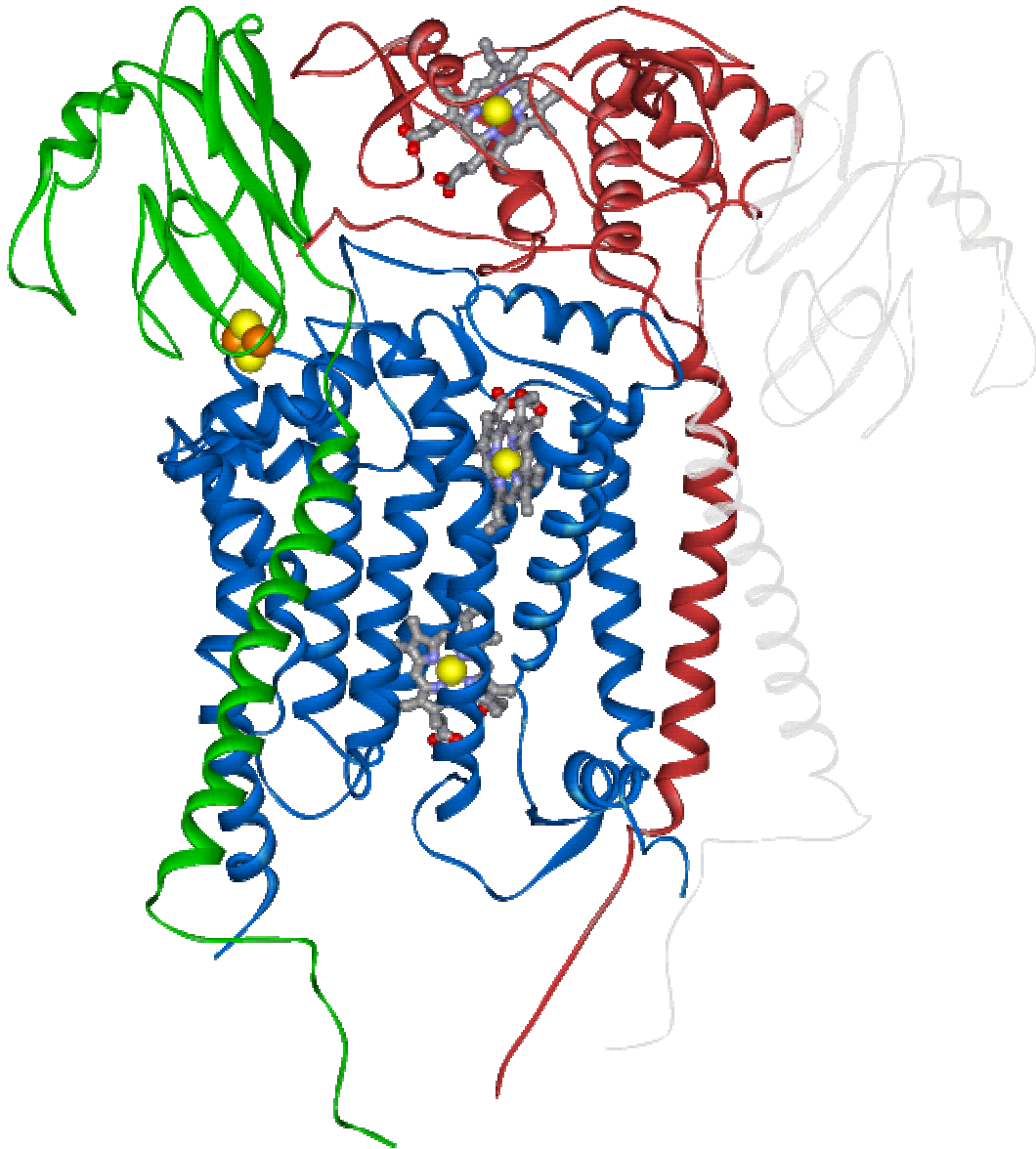


Abbildung 1.3: Die Struktur der drei katalytischen Untereinheiten des bc_1 -Komplexes aus *Saccharomyces cerevisiae* (Hunte *et al.*, 2000). Das Cytochrom *b* ist in blau, das Cytochrom *c*₁ in rot und das Rieske Protein in grün dargestellt. Der bc_1 -Komplex aus Hefe liegt als Dimer vor, in dem das Rieske Protein des einen Monomers – wie hier gezeigt – jeweils mit dem Cytochrom *b* und dem Cytochrom *c*₁ des anderen Monomers wechselwirkt. Das Rieske Protein des anderen Monomers ist in dieser Abbildung schematisch in grau dargestellt.

Da bislang noch keine Struktur eines prokaryotischen bc_1 -Komplexes vorliegt, wurde in dieser Arbeit ausschließlich auf Strukturdaten der bereits kristallisierten mitochondrialen Komplexe (Iwata *et al.*, 1998; Berry *et al.*, 1999; Hunte *et al.*, 2000) zurückgegriffen, da die jeweiligen Untereinheiten der Proteinkomplexe eine relativ hohe Sequenz-Homologie zueinander aufweisen.

Das Cytochrom b besitzt acht membranständige Helices und eine transversale Helix. N- und C-Terminus befinden sich im Cytoplasma des Bakteriums, während die beiden b -Typ Häme (b_L und b_H) in der Membran liegen (siehe Abbildung 1.3).

Das Rieske Protein besitzt einen N-terminalen Membrananker. Der Fe-S-Cluster liegt auf der periplasmatischen Seite.

Das Cytochrom c_1 ist durch eine C-terminale Helix in der Plasmamembran verankert. Das kovalent verknüpfte Häm ist ebenfalls periplasmatisch lokalisiert.

In der Atmungskette von *Paracoccus denitrificans* dient das Cytochrom c_1 als Elektronendonator für das ebenfalls membranständige Cytochrom c_{552} , welches als Elektronenmediator zwischen Komplex III und der terminalen aa_3 -Oxidase fungiert.

Die Wechselwirkung zwischen Cytochrom c_1 und Cytochrom c_{552} ist der hauptsächliche Gegenstand dieser Arbeit. Die Gene des *Paracoccus* bc_1 -Komplexes sind in einem Operon – dem *fbc*-Operon – organisiert, welches für die drei genannten Genprodukte codiert (Kurowski und Ludwig, 1987; Gerhus *et al.*, 1990).

Vergleicht man die Sequenz des *P. denitrificans* Cytochrom c_1 Genproduktes mit denen anderer prokaryotischer und mitochondrialer Cytochrom c_1 Untereinheiten so fällt auf, dass dieses prokaryotische Protein eine für *Paracoccus* charakteristische zusätzliche N-terminale Domäne von ca. 150 Aminosäuren besitzt (Kurowski und Ludwig, 1987). Diese hat zudem eine sehr auffällige Seitenkettenzusammensetzung; so sind hier ca. 40% aller enthaltenen Reste sauer, weitere 40% sind Alanine, und man findet keine einzige positiv geladene Aminosäure.

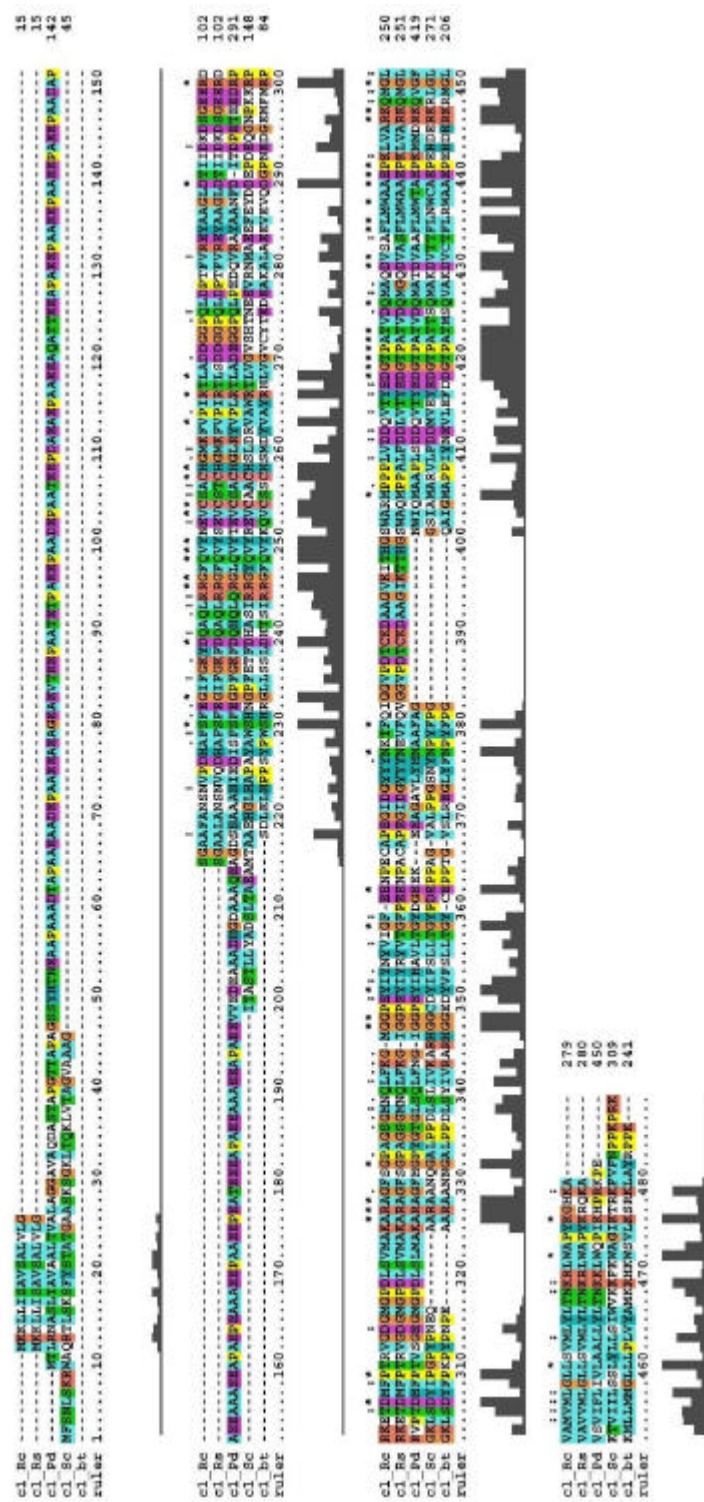


Abbildung 1.4: Die Aminosäuresequenzen des Cytochrom c_1 aus unterschiedlichen Organismen im Vergleich zueinander. Die gezeigte Abbildung wurde mit dem Programm *Clustal X* erstellt. Die grauen Balken unter der Aminosäuresequenz geben den Grad der Konservierung jedes einzelnen Restes an. Zudem wurde jede Aminosäure in einer konservierten Region mit einer Farblegende versehen: hellblau = hydrophobe Region (Reste: M, F, L, I, W, A, V); dunkelblau = Aromaten (Reste Y, H); lila = saure Region (Reste: D, E); rot = basische Region (Reste: K, R); grün = H-Brückenbildner (Reste: S, N, T, Q); Glycin ist orange, Prolin gelb und Cystein rosa dargestellt. Textlegende: Rc = *Rhodobacter capsulatus*; Rs = *Rhodobacter sphaeroides*; Pd = *P. denitrificans*; Sc = *Saccharomyces cerevisiae*; bt = *bos taurus*.

Bei der Betrachtung der mitochondrialen bc_1 -Komplexe, die – wie bereits erwähnt – zu den vier katalytischen Zentren noch weitere Untereinheiten tragen, gilt es als allgemein anerkannt, dass andere Untereinheiten die Funktion dieser sauren Domäne übernehmen. In dem von So Iwata kristallisierten bc_1 -Komplex aus Rinderherz wird diese Rolle der Untereinheit 8 (dem sog. „hinge“ Protein) zugeordnet. Diese Untereinheit liegt in direkter Assoziation mit dem Cytochrom c_1 vor und besitzt eine Vielzahl exponierter saurer Reste (Stonehuerner *et al.*, 1985). In fast allen Organismen sind solche sauren Proteindomänen, die in direktem Kontakt mit dem löslichen Teil des membrangebundenen Cytochrom c_1 stehen, bereits charakterisiert und beschrieben worden. (Kim und King, 1983; Kim *et al.*, 1987; Otha *et al.*, 1987; Kim und Zitomer, 1990). Weiterhin gilt es als allgemein anerkannt, dass die Wechselwirkung zwischen Cytochrom bc_1 und Cytochrom c sowohl in mitochondrialen als auch in prokaryotischen Systemen elektrostatischer Natur ist. So konnte die Arbeitsgruppe um Francis Millett anhand von Mutagenesestudien zeigen, dass bei *Rhodobacter sphaeroides* mehrere saure exponierte Reste auf der periplasmatisch gelegenen Seite des Cytochrom c_1 maßgeblich an der Wechselwirkung zwischen dem *R. sphaeroides* bc_1 und Pferdeherz Cytochrom c beteiligt sind (Tian *et al.*, 2000).

Das *Paracoccus* Cytochrom c_1 ist jedoch das einzige beschriebene Cytochrom, in dem diese zusätzliche saure Domäne Teil des eigentlichen Genproduktes ist.

1.2.3 Das Cytochrom c_{552} aus *P. denitrificans*

Für *P. denitrificans* konnte das membranständige Cytochrom c_{552} als der Elektronenüberträger zwischen Komplex III und Komplex IV charakterisiert werden (Berry und Trumpower, 1985). Dieses c -Typ Cytochrom besitzt ein apparentes Molekulargewicht von 22 kDa und zeigt im Redox-Differenzspektrum ein Extinktionsmaximum bei 551 nm (dieses Extinktionsmaximum wurde zunächst bei 552 nm bestimmt, was zu dem Namen Cytochrom c_{552} führte, der – auch nach Korrektur der Messung – beibehalten wurde). Das Strukturgen *cycM* des Cytochrom c_{552} konnte isoliert und charakterisiert werden (Turba, 1993). Demnach codiert *cycM* für ein 176 Aminosäuren großes Protein, welches sich in drei Domänen unterteilen lässt, die sich durch Hydrophobizität und Ladung unterscheiden. Der N-terminale Membrananker und die C-terminale funktionelle Domäne werden durch die sog. flexible Region voneinander getrennt. Es konnten zwei lösliche Fragmente des Cytochrom c_{552} heterolog in *E. coli*

exprimiert werden (Reincke *et al.*, 1999). Das kürzere der beiden Fragmente – das sog Cytochrom c_{552} – besitzt mit 100 Aminosäuren ein Molekulargewicht von 10.5 kDa und enthält lediglich die lösliche funktionelle Domäne. Für dieses Fragment konnten die Lösungsstrukturen beider Redoxzustände erfolgreich mittels multidimensionaler, heteronuklearer NMR Experimente aufgeklärt werden (Pristovšek *et al.*, 2000a; Pristovšek *et al.*, 2000b; Lücke *et al.*, 2000). Zudem konnten die Kristallstrukturen für beide Redoxzustände mit hoher Auflösung bestimmt werden (Harrenga *et al.*, 2000).

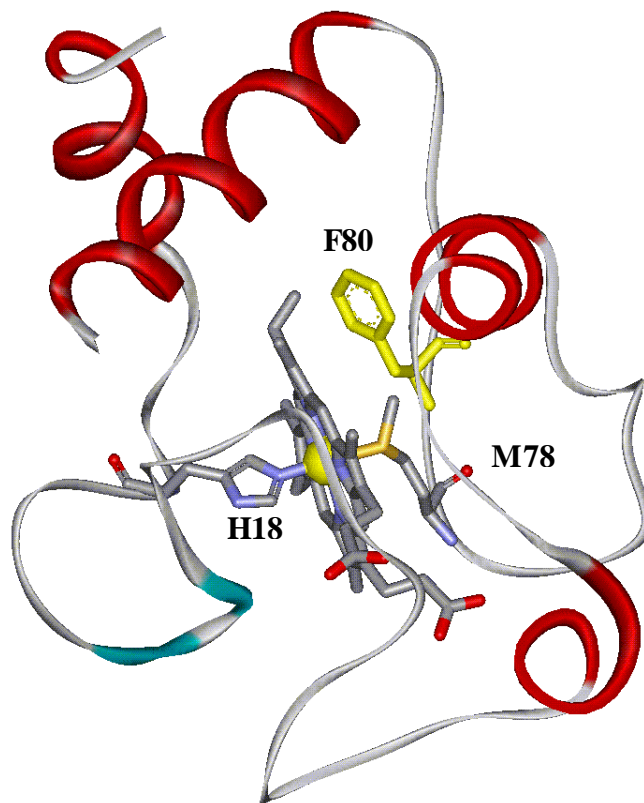


Abbildung 1.5: Struktur des löslichen Fragments Cytochrom c_{552} aus *P. denitrificans* (Harrenga *et al.*, 2000). Das Häm wird durch die beiden dargestellten Reste Methionin 78 und Histidin 18 im Protein koordiniert. Als Elektroneneintrittspunkt wird das gelb dargestellte Phenylalanin 80 diskutiert.

Auf der Oberfläche des Cytochrom c_{552} befinden sich in unmittelbarer Umgebung der Hämspalte zahlreiche Lysinreste, welche die Kontaktfläche zur Cytochrom-*c*-Oxidase bilden, die zahlreiche saure Reste auf ihrer Oberfläche trägt. Ähnlich wie die Reaktion

zwischen Pferdeherz Cytochrom *c* und Cytochrom-*c*-Oxidase aus *P. denitrificans* (Witt *et al.*, 1995; Witt *et al.*, 1998) geht auch die Reaktion zwischen den homologen Reaktionspartnern Cytochrom *c*₅₅₂ und Cytochrom-*c*-Oxidase aus *P. denitrificans* auf elektrostatische Wechselwirkungen zurück (Drosou *et al.*, 2002).

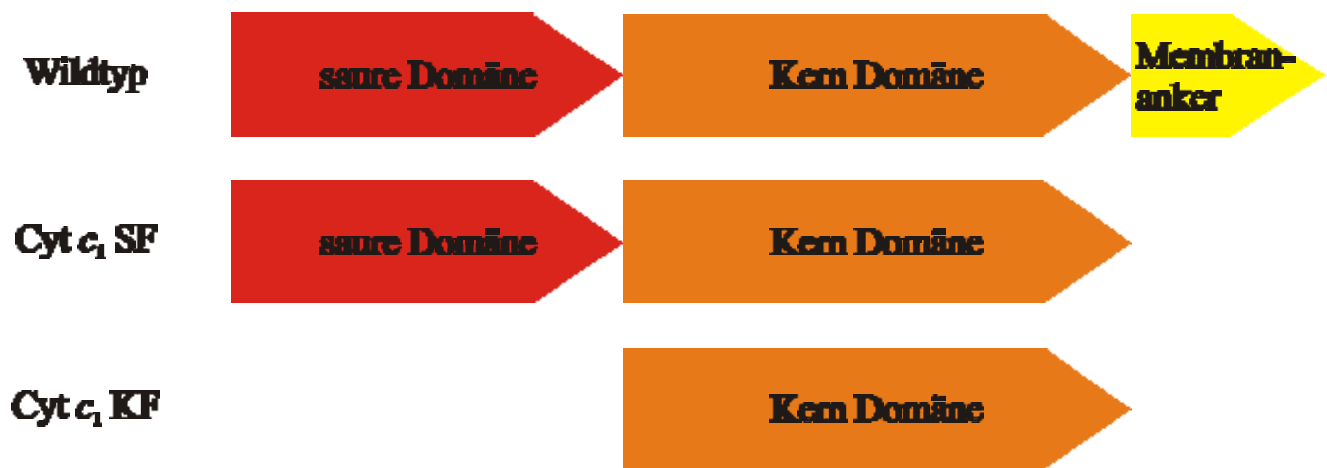
1.2.4 Das Cytochrom *c*₅₅₀ aus *P. denitrificans*

Für *P. denitrificans* sind insgesamt siebzehn lösliche und membrangebundene *c*-Typ Cytochrome identifiziert und beschrieben worden (Bosma *et al.*, 1987; Harms und van Spanning, 1991; Baker *et al.*, 1998). Lediglich das membrangebundene Cytochrom *c*₅₅₂ und das lösliche Cytochrom *c*₅₅₀ können jedoch vom *bc*₁ Komplex reduziert und von der *aa*₃ Cytochrom-*c*-Oxidase oxidiert werden. Das Cytochrom *c*₅₅₀ besitzt ein Molekulargewicht von 14 kDa und liegt als löslicher Elektronentransporter im Periplasma vor. Trotz hoher Sequenzhomologien des Cytochrom *c*₅₅₀ zu dem mitochondrialen Cytochrom *c*, speziell im Hinblick auf die Aminosäuresequenz im Bereich der Hämspalte (Ambler *et al.*, 1981; Timkovich *et al.*, 1976a; Timkovich *et al.*, 1976b), erscheint eine analoge Funktion beider Proteine unwahrscheinlich, da die Atmungskette von *P. denitrificans* durch eine Deletion des Cytochrom *c*₅₅₀ nicht wesentlich gehemmt wird (van Spanning *et al.*, 1990; Moir und Ferguson, 1994), und da *Paracoccus* selbst mit artfremdem mitochondrialem Cytochrom *c* höhere Wechselzahlen zeigt als mit seinem Cytochrom *c*₅₅₀ (Smith *et al.*, 1976; Smith und Davies, 1991). Die Hauptaufgabe des Cytochrom *c*₅₅₀ besteht in der Übertragung von Elektronen auf die NO₂-, NO- und N₂O-Reduktase; möglicherweise fungiert es aber auch als alternativer bzw. zusätzlicher Elektronenüberträger auf die *aa*₃ Oxidase (Harms und van Spanning, 1991; De Gier *et al.*, 1995; Otten *et al.*, 2001). Zudem ist das Cytochrom *c*₅₅₀ ein Substrat der *cbb*₃-Oxidase (Baker *et al.*, 1998).

1.3 Untersuchungen am Cytochrom *c*₁ aus *Paracoccus denitrificans*

Möchte man – wie im Falle von Cytochrom *c*₁ und Cytochrom *c*₅₅₂ – die Wechselwirkungen zweier membrangebundener Redox-Reaktionspartner untersuchen, so

bietet es sich (z. B. im Hinblick auf Stopped Flow Untersuchungen) an, mit löslichen Fragmenten zu arbeiten. Zu Beginn dieser Arbeit lag das lösliche Fragment der aktiven Domäne von Cytochrom c_{552} (Cytochrom c_{552}' , siehe Abbildung 1.5) aus *P. denitrificans* bereits vor (Reincke, 1996; Reincke, 1999). Die erste Zielsetzung dieser Arbeit bestand somit darin, funktionelle, lösliche Fragmente des Cytochrom c_1 aus *P. denitrificans* herzustellen. Hierzu wurden zunächst zwei Fragmente kloniert (siehe Abbildung 1.6): das sog. saure Fragment (SF), in dem lediglich der Membrananker deletiert wurde, und ein weiteres Fragment, das sog. Kernfragment, welches als eine Art minimalisiertes Cytochrom c_1 anzusehen ist. Im Kernfragment (KF) sind sowohl die saure Domäne als auch der Membrananker deletiert. Dieses Protein ist mit seinem Molekulargewicht von



23.7 kDa zudem für mögliche Untersuchungen zur Strukturermittlung relativ gut geeignet. In der folgenden Abbildung sind die Fragmente schematisch im Vergleich zum Wildtyp des Cytochrom c_1 dargestellt.

Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der hergestellten löslichen Fragmente des Cytochrom c_1 aus *P. denitrificans* im Vergleich zum Wildtyp. Der C-terminale Membrananker (in gelb dargestellt) wurde bei beiden Fragmenten (KF und SF) entfernt. Die Kern Domäne (in orange dargestellt) trägt das kovalent verknüpfte Häm. Die saure Domäne (in rot dargestellt) wurde im Kernfragment zusätzlich deletiert.

Aufgrund schlechter Ausbeuten bei der homologen Expression löslicher Cytochrome in *P. denitrificans* (Reincke, 1996) bot sich im Falle der löslichen Cytochrom c_1 Fragmente KF und SF ebenfalls die heterologe Expression in *E. coli* an.

1.4 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es zunächst zwei lösliche Fragmente des Cytochrom c_1 aus *P. denitrificans* zu konstruieren und in *E. coli* heterolog zur Expression zu bringen. Die Expression und Reinigung sollte in einem weiteren Schritt dahingehend optimiert werden, dass größere Mengen an aufgereinigtem Protein zur Verfügung standen, um dieses für strukturelle und funktionelle Untersuchungen heranziehen zu können.

Durch kinetische Untersuchungen sollte die Elektronentransfer-Reaktion des Cytochrom c_1 mit seinem Elektronenakzeptor, dem Cytochrom c_{552} , charakterisiert werden. Es sollte untersucht werden, inwieweit die saure Domäne des Cytochrom c_1 die Wechselwirkung zwischen Cytochrom c_1 und Cytochrom c_{552} beeinflusst. Durch zielgerichtete Mutagenese am Cytochrom c_1 und anschließende kinetische Charakterisierung der Konstrukte sollte die funktionelle Bedeutung einzelner Aminosäurereste dargestellt werden.

2. Materialien

2.1 Chemikalien

Sämtliche im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Chemikalien wurden von den Firmen Roth, Merck, Boehringer, Biomol, Serva und Sigma in der höchstmöglichen Reinheitsstufe (meist p.a. Qualität) bezogen. Auf etwaige Abweichungen wird im Text hingewiesen.

2.2 Biochemikalien

DNA modifizierende Enzyme	MBI Fermentas, NEB, Promega, Biomol
Restriktionsenzyme	Gibco BRL, MBI Fermentas, NEB
Protein A-Alkalische Phosphatase Konjugat	Sigma
Pferdeherz Cytochrom <i>c</i>	Sigma
Lysozym	Biomol
<i>Taq</i> DNA Polymerase, rekombinant	AK Prof. T. Dinger mann
<i>Pfu</i> Turbo™ DNA Polymerase	Stratagene
Anti- <i>bc</i> ₁ Antiserum („R“)	B. Ludwig
IPTG	Biomol

2.3 Kits

<i>QIAquick</i> ® PCR Purification Kit	QIAGEN
^{T7} Sequencing™ Kit	Pharmacia
<i>Big Dye</i> ™ Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
<i>DyeEx</i> ® Kit	QIAGEN

<i>NucleoSpin</i> [®] Plasmid Kit	Macherey & Nagel
<i>QIAquick</i> [®] Plasmid Purification Kit	QIAGEN
<i>NucleoSpin</i> [®] Extract Kit	Macherey & Nagel

2.4 Plasmide

2.4.1 Übersicht verwendete Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Herkunft
PET 22b (+)	Amp ^R , pel B leader, T7 promotor	Novagen
pSelect- <i>fbc</i>	Tet ^R , <i>fbc</i> -Operon aus <i>P. denitrificans</i>	M. Korn
pAlter Ex-1	Tet ^R , Amp ^S , SP6, T7, <i>tac</i> , <i>fl</i>	Promega
PUC19-CycA	Amp ^R , <i>cycA</i> -Gen aus <i>P. denitrificans</i>	R. van Spanning
p34S-Km3	Amp ^R , Kan ^R	J. J. Dennis, G. J. Zylstra
PQE 30	Amp ^R , His-tag, T5 promotor	QIAGEN
PQE 60	Amp ^R , His-tag, T5 promotor	QIAGEN
pKKDFPase	Amp ^R , ompA, His-tag	J. Hartleib
PEG471	Sm ^R , <i>fbcC_Δacid</i> – in frame Deletion der sauren Domäne	E. Gerhus
PEC86	Cm ^R , <i>ccm</i> ABCDEFGH in pACYC184	L. Thöny-Meyer

Tabelle 2.1: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten und nicht selbst hergestellten Plasmide. Die Herkunft des jeweiligen Plasmids ist in der rechten Spalte angegeben.

2.4.2 Übersicht hergestellte Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Herkunft
PET_Cyt c_1 (KF) _{WT}	pET 22b(+) + Cyt c_1 KF Wildtyp (<i>Nco</i> I/ <i>Hind</i> III)	diese Arbeit
PET_Cyt c_1 (KF) _{Muta*}	pET 22b(+) + Cyt c_1 KF Mutanten (<i>Nco</i> I/ <i>Hind</i> III)	diese Arbeit
PET_Cyt c_1 (SF) _{WT}	pET 22b(+) + Cyt c_1 SF Wildtyp (<i>Nco</i> I/ <i>Hind</i> III)	diese Arbeit
pAlter_Cyt c_1 (KF) _{WT}	pAlter Ex-1 + Cyt c_1 KF Wildtyp (<i>Nco</i> I/ <i>Hind</i> III)	diese Arbeit
pAlter_Cyt c_1 (KF) _{Muta*}	pAlter Ex-1 + Cyt c_1 KF Mutanten (<i>Nco</i> I/ <i>Hind</i> III)	diese Arbeit
PEC86 Kan ^R	pEC86 mit Kan ^R -Kassette, Cm ^S (<i>Sal</i> I)	diese Arbeit
PET_Cyt c_{550} (KF) _{WT}	pET 22b(+) + Cyt c_{550} Wildtyp (<i>Nco</i> I/ <i>Hind</i> III)	diese Arbeit

Tabelle 2.2: Übersicht der in dieser Arbeit hergestellten Plasmide. Aus Gründen der Überschaubarkeit wurde hierbei darauf verzichtet, alle mutierten Konstrukte des Cytochrom c_1 einzeln aufzuführen. Alle in dieser Arbeit hergestellten mutierten Konstrukte liegen als pAlter_Cyt c_1 (KF)- bzw. als pET_Cyt c_1 (KF)-Derivat vor (Bezeichnung: Muta*)

2.5 Primer

Die in dieser Arbeit konstruierten und verwendeten Oligonukleotide wurden ausschließlich durch die Firma Biospring (Frankfurt am Main) synthetisiert. Im folgenden findet sich eine Übersicht der verwendeten Primer.

2.5.1 Primer für die Fragmentkonstruktion

Name

Sequenz

Cytc₁*Hind*_{pET}

5'- CACCGAGACGAAAAGCTTTTCACTTGCGATCCATCATCTT - 3'

Cytc₁_Nco(KF)_{pET}5'- ACGAAGCCGCCATGGATCATGGCGACGCGGCCCGCTC - 3'**Cytc₁_Hind(SF)_{pET}**5'- CAGGCGGCGCCGCCATGGACGCAAGCACCGCGCCCGGCACGACG-3'**Cytc₁_Eco(KF)_{pET}**5'- TTTTGAGAATTCATTAAAGAGGAGATATACATATGAA - 3'**Cytc₁_Eco(KF)_{pQE}**5'- CACACAGAGAATTCATTAAAGAGGAGAAATTAACATATGAGAGGA - 3'**Cytc₅₅₀_Nco_{pET}**5'- CTGCCCCGCCATGGCCCAGGATGGCGACGCCGCCAAA - 3'**Cytc₅₅₀_Hind_{pET}**5'- ATCTCGGAGGCGAAAGCTTTCAGTTCGATTCGCCCTCGGC - 3'**2.5.2 Sequenzierprimer**

T7_Prom 5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG - 3'

T7_Term 5'- GCT AGT TAT TGC TCA GCG G - 3'

M13(+)_Prom 5'- AGT CAC GAC G TT GTA - 3'

M13(+)_Term 5'- CAG GAA ACA GCT ATG AC - 3'

2.5.3 MutageneseprimerCytc₁_E243Q 5'- CTTGCAGGTCTATACCCCAGGTCTGCTCGGCCTGC - 3'Cytc₁_E243K 5'- CTTGCAGGTCTATACCCAAGGTCTGCTCGGCCTGC - 3'Cytc₁_N278D 5'- CCGCGCCTATGCCGCGGACTTCGACATCACCGAC - 3'Cytc₁_D283N 5'- GAACTTCGACATCACCAAATCCGGAAACCGAAGAG - 3'Cytc₁_D349K 5'- CGTCCTGACCGGCTATAAAGGGCGAGGAAAAGGAA - 3'

Cytc ₁ _E351Q	5'- GACCGGCTATGACGGC <u>CAG</u> GAAAAGGAAGAGGCA - 3'
Cytc ₁ _E351K	5'- GACCGGCTATGACGGC <u>AAG</u> GAAAAGGAAGAGGCA - 3'
Cytc ₁ _E352Q	5'- CGGCTATGACGGCGAG <u>CAG</u> AAGGAAGAGGCAGGC - 3'
Cytc ₁ _E352K	5'- CGGCTATGACGGCGAG <u>AAG</u> AAGGAAGAGGCAGGC - 3'
Cytc ₁ _E354Q	5'- TGACGGCGAGGAAAAG <u>CAA</u> GAGGCAGGCGCGGT - 3'
Cytc ₁ _E354K	5'- TGACGGCGAGGAAAAG <u>AAA</u> GAGGCAGGCGCGGTG - 3'
Cytc ₁ _E355Q	5'- CGGCGAGGAAAAGGAA <u>CAG</u> GCAGGCGCGGTGCT - 3'
Cytc ₁ _E355K	5'- CGGCGAGGAAAAGGAA <u>AAG</u> GCAGGCGCGGTGCT - 3'

2.6 Stämme

2.6.1 Übersicht verwendete Stämme

2.6.1.1 *E. coli*:

Stamm	genetischer Marker	Herkunft
BL21 (DE3)	<i>ompT hsdS</i> (rB ⁻ mB ⁻) <i>dcm</i> +Tetr <i>gal</i> (DE3) <i>endA</i> Hte	Stratagene
BL21 (DE3_pLysS)	<i>ompT hsdS</i> (rB ⁻ mB ⁻) <i>dcm</i> +Tetr <i>gal</i> (DE3) <i>endA</i> Hte [pLysS Cm ^R] _a	Stratagene
BL21 (DE3_CodonPlus ^{RIL})	<i>ompT hsdS</i> (rB ⁻ mB ⁻) <i>dcm</i> + Tet ^r <i>gal</i> λ <i>endA</i> Hte [<i>argU ileY leuW</i> Cm ^R]	Stratagene
JM 109	<i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺), <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , λ ⁻ , Δ (<i>lac-proAB</i>), [F', <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>laqI</i> ^{qZ} Δ M15]	Hanahan, 1985
DH5 α	<i>supE44</i> , <i>lacU169</i> (Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15), <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i>	Hanahan, 1983 Bethesda, 1986

BMH 71-18 <i>mutS</i>	<i>thi</i> , <i>supE</i> , $\Delta(lac-proAB)$, [<i>mutS</i> ::Tn10] [<i>F'</i> , <i>proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ , <i>laqI</i> ^q Z Δ M15]	Kramer <i>et al.</i> , 1984; Zell und Fritz, 1987
ES1301 <i>mutS</i>	<i>lacZ</i> 53(Am) LAM – <i>mutS</i> 201::Tn5 <i>thyA</i> 36 IN(rrnD-rrnE)1 <i>rha</i> -5 <i>metB</i> 1 <i>deoC</i> 2	Stratagene
ER1451	<i>F'</i> [<i>tra</i> Δ 36 <i>lacI</i> ^q $\Delta(lacZ)$ M15] <i>proAB</i> /e14-(<i>mcrA</i> -), <i>thi</i> $\Delta(lac-$ <i>proAB</i>), <i>gyrA</i> 96(Nal ^r), <i>endA</i> 1, <i>hsdR</i> 17(<i>r</i> _K ⁻ <i>m</i> _K ⁺) <i>relA</i> 1, <i>supE</i> 44	Promega

Tabelle 2.3: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten und nicht selbst hergestellten *E. coli* Stämme. Die Herkunft der jeweiligen Stämme ist in der rechten Spalte angegeben.

2.6.1.2 *P. denitrificans*:

Stamm	genetischer Marker	Herkunft
PD 1222	<i>Spc</i> ^R , <i>Rif</i> ^R , enhanced mating frequency	de Vries <i>et al.</i> , 1989
MK6	PD 1222 Derivat, <i>Km</i> ^R , chromosomale Deletion des <i>fbc</i> Operon	Marcus Korn, 1998

Tabelle 2.4: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten und nicht selbst hergestellten *P. denitrificans* Stämme. Die Herkunft der jeweiligen Stämme ist in der rechten Spalte angegeben.

2.6.2 Übersicht hergestellte Stämme

Name	Ausgangsstamm	Plasmid(e)	Resistenz
AE 1	<i>E. coli</i> [BL21 (DE3)]	+ pET 22b_Cyt <i>c</i> ₁ (KF) _{WT}	Amp
AE 2	<i>E. coli</i> [BL21 (DE3)]	+ pET 22b_Cyt <i>c</i> ₁ (KF) _{WT} + pEC 86	Amp/Cm
AE 3	<i>E. coli</i> [BL21 (DE3)]	+ pET 22b_Cyt <i>c</i> ₁ (SF) _{WT}	Amp
AE 4	<i>E. coli</i> [BL21 (DE3)]	+ pET 22b_Cyt <i>c</i> ₁ (SF) _{WT} + pEC 86	Amp/Cm
AE 5	<i>E. coli</i> [BL21 (DE3)]	+ pKKDFPase_Cyt <i>c</i> ₁ (KF) _{WT}	Amp

AE 6	<i>E. coli</i> [BL21 (DE3)]	+ pKKDFPase_Cyt <i>c</i> ₁ (KF) _{WT} + pEC 86	Amp/Cm
AE 7	<i>E. coli</i> [BL21 (DE3)]	+ pQE_Cyt <i>c</i> ₁ (KF) _{WT}	Amp
AE 8	<i>E. coli</i> [BL21 (DE3)]	+ pQE_Cyt <i>c</i> ₁ (KF) _{WT} + pEC86	Amp/Cm
AE 9	<i>E. coli</i> [BL21 (DE3)]	+ pAlter_Cyt <i>c</i> ₁ (KF) _{WT}	Amp/Tet
AE 10	<i>E. coli</i> [BL21 (DE3)]	+ pAlter_Cyt <i>c</i> ₁ (KF) _{E243Q}	Amp/Tet
AE 11	<i>E. coli</i> [BL21 (DE3)]	+ pET 22b_Cyt <i>c</i> ₁ (KF) _{E243Q}	Amp
AE 12	<i>E. coli</i> [BL21 (DE3)]	+ pET 22b_Cyt <i>c</i> ₁ (KF) _{E243Q} + pEC 86	Amp/Cm
AE 13	<i>E. coli</i> [BL21 (DE3)]	+ pAlter_Cyt <i>c</i> ₁ (KF) _{E243K}	Amp/Tet
AE 14	<i>E. coli</i> [BL21 (DE3)]	+ pET 22b_Cyt <i>c</i> ₁ (KF) _{E243K}	Amp
AE 15	<i>E. coli</i> [BL21 (DE3)]	+ pET 22b_Cyt <i>c</i> ₁ (KF) _{E243K} + pEC 86	Amp/Cm
AE 16	<i>E. coli</i> [BL21 (DE3)]	+ pAlter_Cyt <i>c</i> ₁ (KF) _{N278D}	Amp/Tet
AE 17	<i>E. coli</i> [BL21 (DE3)]	+ pET 22b_Cyt <i>c</i> ₁ (KF) _{N287D}	Amp
AE 18	<i>E. coli</i> [BL21 (DE3)]	+ pET 22b_Cyt <i>c</i> ₁ (KF) _{N287D} + pEC 86	Amp/Cm
AE 19	<i>E. coli</i> [BL21 (DE3)]	+ pAlter_Cyt <i>c</i> ₁ (KF) _{D283N}	Amp/Tet
AE 20	<i>E. coli</i> [BL21 (DE3)]	+ pET 22b_Cyt <i>c</i> ₁ (KF) _{D283N}	Amp
AE 21	<i>E. coli</i> [BL21 (DE3)]	+ pET 22b_Cyt <i>c</i> ₁ (KF) _{D283N} + pEC 86	Amp/Cm
AE 22	<i>E. coli</i> [BL21 (DE3)]	+ pAlter_Cyt <i>c</i> ₁ (KF) _{D349K}	Amp/Tet
AE 23	<i>E. coli</i> [BL21 (DE3)]	+ pET 22b_Cyt <i>c</i> ₁ (KF) _{D349K}	Amp
AE 24	<i>E. coli</i> [BL21 (DE3)]	+ pET 22b_Cyt <i>c</i> ₁ (KF) _{D349K} + pEC 86	Amp/Cm
AE 25	<i>E. coli</i> [BL21 (DE3)]	+ pAlter_Cyt <i>c</i> ₁ (KF) _{E351K}	Amp/Tet
AE 26	<i>E. coli</i> [BL21 (DE3)]	+ pET 22b_Cyt <i>c</i> ₁ (KF) _{E351K}	Amp
AE 27	<i>E. coli</i> [BL21 (DE3)]	+ pET 22b_Cyt <i>c</i> ₁ (KF) _{E351K} + pEC 86	Amp/Cm
AE 28	<i>E. coli</i> [BL21 (DE3)]	+ pAlter_Cyt <i>c</i> ₁ (KF) _{E352K}	Amp/Tet

AE 29	<i>E. coli</i> [BL21 (DE3)]	+ pET 22b_Cyt <i>c</i> ₁ (KF) _{E352K}	Amp
AE 30	<i>E. coli</i> [BL21 (DE3)]	+ pET 22b_Cyt <i>c</i> ₁ (KF) _{E352K} + pEC 86	Amp/Cm
AE 31	<i>E. coli</i> [BL21 (DE3)]	+ pAlter_Cyt <i>c</i> ₁ (KF) _{E354Q}	Amp/Tet
AE 32	<i>E. coli</i> [BL21 (DE3)]	+ pET 22b_Cyt <i>c</i> ₁ (KF) _{E354Q}	Amp
AE 33	<i>E. coli</i> [BL21 (DE3)]	+ pET 22b_Cyt <i>c</i> ₁ (KF) _{E354Q} + pEC 86	Amp/Cm
AE 34	<i>E. coli</i> [BL21 (DE3)]	+ pAlter_Cyt <i>c</i> ₁ (KF) _{E354K}	Amp/Tet
AE 35	<i>E. coli</i> [BL21 (DE3)]	+ pET 22b_Cyt <i>c</i> ₁ (KF) _{E354K}	Amp
AE 36	<i>E. coli</i> [BL21 (DE3)]	+ pET 22b_Cyt <i>c</i> ₁ (KF) _{E354K} + pEC 86	Amp/Cm
AE 37	<i>E. coli</i> [BL21 (DE3)]	+ pAlter_Cyt <i>c</i> ₁ (KF) _{E355Q}	Amp/Tet
AE 38	<i>E. coli</i> [BL21 (DE3)]	+ pET 22b_Cyt <i>c</i> ₁ (KF) _{E355Q}	Amp
AE 39	<i>E. coli</i> [BL21 (DE3)]	+ pET 22b_Cyt <i>c</i> ₁ (KF) _{E355Q} + pEC 86	Amp/Cm
AE 40	<i>E. coli</i> [BL21 (DE3)]	+ pAlter_Cyt <i>c</i> ₁ (KF) _{E355K}	Amp/Tet
AE 41	<i>E. coli</i> [BL21 (DE3)]	+ pET 22b_Cyt <i>c</i> ₁ (KF) _{E355K}	Amp
AE 42	<i>E. coli</i> [BL21 (DE3)]	+ pET 22b_Cyt <i>c</i> ₁ (KF) _{E355K} + pEC 86	Amp/Cm
AE 43	<i>P. denitrificans</i> [MK6]	+ pEG471	Rif/Sm/Kan

Tabelle 2.6: Übersicht der in dieser Arbeit hergestellten Stämme (*E. coli* und *P. denitrificans*).

2.7 Lösungen

2.7.1 Medien

Alle Angaben beziehen sich auf ein Volumen von 1 Liter Kulturmedium.

2.7.1.1 LB-Medium (*Luria-Bertani-Medium*)

Bactotrypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
pH 7.5 mit 1 M NaOH einstellen, autoklavieren	

2.7.1.2 TY-Medium

Pepton	8 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
pH 7.0 mit 1 M NaOH einstellen, autoklavieren	

2.7.1.3 M9-Medium (*Minimal-Medium*)

Na ₂ HPO ₄	6 g
KH ₂ PO ₄	3 g
NaCl	0.5 g
NH ₄ Cl	1 g
pH 7.4 mit 1 M NaOH einstellen, autoklavieren, anschließend werden folgende sterile Lösungen / Komponenten zugegeben	

1M MgSO ₄	1 ml
1M CaCl ₂	1 ml
Glycerin	0.1 % (v/v)
NH ₄ Cl	1 g

Zusätzlich wurden die Zellen in unmarkiertem BioExpress¹⁰⁰⁰-Vollmedium (Cambridge Isotope Lab., Andover, MA, USA) und unmarkiertem Martek-Minimalmedium (Martek Bioscience Corp., Columbia, MD, USA) angezogen. Die Medien wurde zuvor nach Angaben des Herstellers steril filtriert.

2.7.1.4 Succinat-Medium

Für die Anzucht von *Paracoccus denitrificans* Stämmen wurde ausschließlich Succinat-Medium verwendet.

K ₂ HPO ₄	50 mM
NH ₄ Cl	10 mM
MgSO ₄	1 mM
Citrat	1 mM
Succinat	40 mM
Spurenelement-Lösung ^{*)}	0.2 ml/Liter
pH 6.2 mit KOH einstellen, autoklavieren	

^{*)} (Spurenelement-Lösung: 15 g CaCl₂ x 2 H₂O, 24.5 g FeCl₃ x 6 H₂O, 10 g MnCl₂ x 4 H₂O, 3.4 g ZnCl₂, 2.4 g CoCl₂ x 2 H₂O, 1.25 g CuSO₄ x 5 H₂O, 0.6 g H₃BO₃, 2.4 g Na₂MoO₄ x 2 H₂O in einem Liter halbkonzentrierter Salzsäure gelöst)

2.7.2 Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration im Medium
Ampicillin	50 mg/ml in 50 % Glycerin	50-200 µg/ml
Chloramphenicol	30 mg/ml in Ethanol	30-120 µg/ml
Kanamycin	25 mg/ml in 50 % Glycerin	25 µg/ml
Rifampicin	15 mg/ml in Methanol	15 µg/ml
Streptomycin	25 mg/ml in 50 % Glycerin	25 µg/ml
Tetracyclin	10 mg/ml in 70 % EtOH	10 µg/ml

Tabelle 2.7: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika.

3. Methoden

3.1 Molekulargenetische Methoden

3.1.0 Kultivierung von Mikroorganismen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich Stämme von *E. coli* und *P. denitrificans* verwendet. Die Anzucht und Kultivierung der Organismen erfolgte grundsätzlich unter der Kontrolle von Antibiotika. *E. coli* wurde in der Regel bei 37 °C (in Einzelfällen auch bei 32 °C, siehe 3.2.2) angezogen und bei 4 °C gelagert. Die Anzucht von *P. denitrificans* erfolgte bei 32 °C, die Lagerung bei Raumtemperatur. Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte in LB, in Einzelfällen – für Isotopen-markierte NMR Experimente – auch in Minimalmedien. Bei *P. denitrificans* wurde nur die Kultivierung im kleinen Maßstab (ü.N.-Kultur für DNA Präparationen) in TY-Medium durchgeführt. Bei Anzuchten in größerem Maßstab wurde für *P. denitrificans* Succinat-Medium verwendet.

3.1.1 Minipräp (Plasmidpräparation)

Es wurden 1.5 ml einer ü.N.-Kultur in einer Eppendorf-Tischzentrifuge (13000 rpm, 10 min, RT) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl *Lösung 1* resuspendiert. Anschließend wurden vorsichtig 200 µl *Lösung 2* zugegeben (alkalische Lyse). Das Gemisch wurde für ca. 1 min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 150 µl kalter *Lösung 3* wurde die Plasmid-DNA renaturiert, während die genomische DNA denaturiert blieb. Nach einer hochoberigen Zentrifugation bei 4 °C wurde die flüssige Phase abgenommen und mit einem Volumen CHCl₃/Phenol/Isoamylalkohol (24:24:1) versetzt. Das Gemisch wurde kräftig durchmischt und anschließend zur Phasentrennung zentrifugiert (13000 rpm, 10 min, RT). Die wässrige Phase wurde abgenommen und mit einem Volumen Chloroform versetzt. Es wurde erneut kräftig durchmischt und abzentrifugiert (13000 rpm, 5 min, RT). Aus der oberen Phase konnte die Plasmid-DNA durch die Zugabe von zwei Volumen Ethanol bei -20 °C gefällt werden. Das Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen und schließlich in 50 µl (bzw. 30 µl) bidestilliertem Wasser aufgenommen. Es folgte eine RNase-Behandlung (30 min, 37 °C).

Lösung 1

Glucose		50 mM
Tris-HCl	pH 8.0	25 mM
EDTA		10 mM

Lösung 2

NaOH		0.2 N
SDS		1.0 %

Lösung 3

Kaliumacetat	pH 5.2	3.0 M
Essigsäure		10 %

3.1.2 Restriktion

Die Reaktionen wurden jeweils nach Angaben des Enzymherstellers durchgeführt. Der Restriktionsverdau erfolgte für 1-2 Stunden bei 37 °C (für *Sfi* I bei 65 °C, für *Sma* I bei 30 °C) im Wasserbad oder über Nacht mit einem mindestens zweifachen Enzymüberschuss. Für analytische Zwecke wurden in der Regel 200 ng Plasmid-DNA geschnitten. In präparativen Ansätzen oder im Falle sehr kleiner Fragmente wurde entsprechend mehr DNA eingesetzt.

3.1.3 Ligation und Transformation

Die T4 DNA Ligase katalysiert unter ATP-Verbrauch die Ausbildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einer freien 5'-Phosphat- und einer benachbarten 3'-Hydroxylgruppe, wodurch DNA-Fragmente in entsprechend vorbehandelte Vektoren eingeführt werden können.

Um bei der Ligation ein Religieren des Vektors zu vermeiden, wurde die 5'-Phosphatgruppe des linearisierten Vektors mit alkalischer Phosphatase (SAP) abgespalten. Hierbei wurde mit 2 Units bei 37 °C für 30 min inkubiert. Die Inaktivierung der SAP erfolgte durch eine 15minütige Inkubation bei 85 °C. Im Ligationsansatz sollte das

Verhältnis von linearisiertem Expressionsvektor zu PCR-Fragment (Insert) ungefähr 1:3 betragen. Der Reaktionsansatz (50 mM Tris/HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 25 µg/µl BSA) wurde zunächst für 1 Stunde bei Raumtemperatur und anschließend im Wasserbad bei 20 °C für weitere 2 Stunden, im Einzelfall auch über Nacht, inkubiert. Die Inaktivierung der Ligase erfolgte bei 65 °C für 10 min. Im Regelfall wurden 5 µl des Ansatzes, in Einzelfällen auch der gesamte Ligationsansatz, in 100 µl kompetente Zellen transformiert. Hierzu wurde zunächst ein Aliquot auf Eis langsam aufgetaut. Nach Zugabe des Ligationsansatzes wurde für 20-30 min auf Eis inkubiert und dann für exakt 60 s bei 42 °C im Wasserbad hitzegeschockt. Daraufhin wurde der Ansatz sofort auf Eis gelagert, zu 900 µl LB gegeben, für weitere 90 min bei 37 °C inkubiert und schließlich 1/10 und 9/10 auf den mit entsprechenden Antibiotika versetzten LB-Platten ausgestrichen. Es folgte eine Inkubation von mindestens 12 Stunden bei 37 °C im Brutschrank.

3.1.4 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden chemisch kompetente Zellen mit CaCl₂ (TCM Puffer) und mit RbCl (RF Puffer) hergestellt. Beide Methoden unterscheiden sich ausschließlich durch die verwendeten Lösungen, so dass beide Verfahren hier analog beschrieben werden können.

Es wurden 100 ml einer *E. coli*-Flüssigkultur aus der logarithmischen Phase (OD₅₄₆ 0.3 bis 0.4) auf Eis abgekühlt und für 10 min bei 4 °C und 4200 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1/2 Volumen TCM/RF1 resuspendiert, und erneut für 60 min auf Eis gehalten. Nach der zweiten Zentrifugation wurde das Pellet in 1/10 Volumen TCM:Glycerin (80:20)/RF2 resuspendiert, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der aliquotierten kompetenten Zellen erfolgte bei -80 °C.

Es wurden hierbei jeweils folgende Lösungen frisch angesetzt und verwendet:

TCM

Tris/HCl	pH 7.0	10 mM
CaCl ₂		100 mM

MgCl ₂	10 mM
-------------------	-------

Lösung RF1

RbCl	100 mM
MnCl ₂	50 mM
Kaliumacetat	30 mM
CaCl ₂	10 mM
Glycerin	15 %
pH mit Essigsäure auf 5.8 einstellen; steril filtrieren.	

Lösung RF2

MOPS	10 mM
RbCl	10 mM
CaCl ₂	75 mM
Glycerin	15 %
pH mit Salzsäure auf 6.8 einstellen; steril filtrieren.	

3.1.5 Konjugation

Das Bakterium *P. denitrificans* lässt sich durch die oben beschriebene Methode nicht mit Fremd-DNA transformieren. Aus diesem Grund musste bei der Herstellung rekombinanter *Paracoccus* Stämme die Methode des triparenteralen Matings (Gerhus *et al.*, 1990) angewendet werden. Hierbei wird das nicht-konjugative Plasmid eines Donorstammes mit Hilfe eines konjugativen Helferstammes (*E. coli* MM294, *tra*-Gene, *mob*-Gene) auf den jeweiligen Rezipienten übertragen.

Es wurden jeweils 100 µl einer ü.N.-Kultur des Donorstammes und des Helferstammes mit 400 µl einer ü.N.-Kultur des Empfängerstammes gemischt und anschließend abzentrifu-

giert (6000 rpm, 2 min, RT). Das erhaltene Pellet wurde in einer minimalen Menge Medium resuspendiert und als Tropfen auf eine TY-Agarplatte pipettiert. Nach einer Inkubation von mindestens 15 Stunden bei 32 °C wurden die Zellen mit Hilfe einer Impföse abgenommen und in 1 ml TY-Medium resuspendiert. Von der erhaltenen Suspension wurden Verdünnungen von 10^0 bis 10^{-3} hergestellt und ausplattiert (100 µl). Die Selektionsplatten enthielten im Falle des triparentalen Matings von MK6 mit pEG471 Rifampicin, Streptomycin und Kanamycin. Nach einer zweitägigen Inkubation bei 32 °C konnten Einzelkolonien abgenommen werden.

3.1.6 Agarosegel-Elektrophorese

Bei der Gelelektrophorese macht man sich die größenabhängige Laufgeschwindigkeit verschiedener DNA-Fragmente im elektrischen Feld zu Nutze. Die Pufferbedingungen werden hierbei so gewählt, dass die DNA in negativ geladener Form vorliegt und somit zur Anode durch das Gel wandert.

Größere Fragmente wandern dabei langsamer als kleinere Fragmente. Plasmide wurden in 0.8 %igen (w/v), kleinere Fragmente in entsprechend höher konzentrierten (bis zu 2.0 %igen) Agarosegelen aufgetrennt. Die Agarose wurde zunächst in TBE (12.1 g/l Tris, 6 g/l Borsäure, 10 mM EDTA) aufgekocht und nach anschließender Abkühlung mit Ethidiumbromid (0.5 µg/ml) versetzt. Die Auftrennung erfolgte in einer Agarose Flachbettkammer bei 5 V/cm Elektrodenabstand in TBE. Alle Proben wurden zuvor mit 20 % (v/v) DNA Stop Puffer (10 mM Tris/HCl, 30 mM EDTA, 5 % Glycerin (v/v), 0.02 % Bromphenolblau (w/v), pH 7.5) versetzt, um das Beladen zu erleichtern und den Lauf der Proben optisch verfolgen zu können. Zur Quantifizierung der DNA-Fragmente wurden jeweils 20 µl eines Molekulargewichtsmarkers (λ -DNA, *Eco* I/*Hind* III) mit auf das Gel aufgetragen. Nach dem Lauf konnte die DNA aufgrund der Interkalation des Ethidiumbromids mit UV-Licht an einem Transilluminator (TMW 20 der Firma UVP) bei einer Wellenlänge von 304 nm bzw. 254 nm sichtbar gemacht werden. Die Banden konnten mit einer Videodokumentationsanlage (Easy Image Plus, Firma Herolab) aufgenommen und in einzelnen Fällen mit Hilfe eines Videoprinters (Video Copy Processor, Mitsubishi) dokumentiert werden.

Bei der präparativen Gelelektrophorese wurden die aufgetrennten DNA-Fragmente mit einer UV-Handlampe (Fa. Bachhofer) bei $\lambda = 365$ nm detektiert und mit einem Skalpell

ausgeschnitten. Anschließend konnte die DNA nach unterschiedlichen Methoden aus dem Gel extrahiert werden.

3.1.7 DNA Extraktion aus Agarosegelen

Im Rahmen dieser Arbeit kamen zwei Verfahren zur Anwendung, die im folgenden beschrieben sind.

3.1.7.1 Phenol Crush Methode

Hierbei wurde das Agaroseblöckchen nach Zugabe von 100 µl H₂O mit einem Teflonstempel mechanisch zerkleinert, mit 300 µl Phenol versetzt und für 30 min bei -20 °C eingefroren. Nach der anschließenden Zentrifugation (13000 rpm, 30 min, RT) wurde die wässrige Phase mit Chloroform extrahiert. Die DNA konnte daraufhin durch die Zugabe von Glykogen (20 mg/ml) und Natriumacetat (0.3 mM) mit 2 Volumen Ethanol bei -20 °C gefällt werden. Das Pellet wurde erneut mit 70 %igem Ethanol gewaschen und in 10 µl H₂O aufgenommen.

3.1.7.2 QIAquick PCR Purification Methode

Insbesondere bei der Extraktion sehr kleiner DNA-Fragmente aus Agarosegelen kam der QIAquick® PCR Purification Kit der Firma QIAGEN zum Einsatz. Dieses Verfahren beruht auf der Bindung von DNA an eine Silikatfritte innerhalb einer kleinen Säule. Es wurde nach dem Handbuch des Herstellers vorgegangen. Die Elution erfolgte mit 25 µl H₂O.

3.1.8 PCR

Mit diesem Verfahren können Nukleotidsequenzen *in vitro* exponentiell amplifiziert werden.

Als Matrize für die PCR-Reaktion diente meist ein linearisierter Vektor. Es wurden synthetische Oligonukleotide als Primer für die thermostabilen Polymerasen eingesetzt. Alle Primer wurden von der Firma Biospring (Frankfurt am Main) synthetisiert. Es wurde zum einen eine rekombinante *Taq* Polymerase aus *Thermophilus aquaticus* und zum anderen die *Pfu* Polymerase der Firma Stratagene eingesetzt. Die *Pfu* Polymerase besitzt im Gegensatz zur *Taq* Polymerase eine zusätzliche „proof-reading“-Eigenschaft und ist

somit aufgrund einer geringeren Fehlerrate bei der Amplifikation größerer Fragmente zu bevorzugen. Die Amplifikation erfolgte in einem Reaktionsvolumen von 100 µl Reaktionspuffer (siehe Angaben des Herstellers) mit je 100 pmol der jeweiligen Primer, 2 mM dNTPs und 10-50 ng linearisiertem Plasmid. Während des ersten Denaturierungszyklus wurden 1-2 Units Polymerase zugegeben. Die Zyklusbedingungen der Herstellung der verschiedenen Fragmente, die im Rahmen dieser Arbeit hergestellt wurden, sind im folgenden angeführt.

Amplifikation der Cyt c₁ Fragmente KF und SF (Nco I/Hind III mit Template aus fbc)

Zyklen- anzahl	Temperatur	Zeit
1	95 °C	2 min
30	95 °C	30 s
	60 °C	40 s
	72 °C	90 s (KF) 120 s (SF)
	95 °C	30 s
1	60 °C	40 s
	72 °C	5 min

Amplifikation des Cyt c₁ Fragments KF_{pQE} (Eco RI/Hind III mit Template aus pET-KF)

Zyklenanzahl	Temperatur	Zeit
1	95 °C	3 min
30	95 °C	30 s
	50 °C	50 s
	72 °C	60 s
	95 °C	30 s

55 °C	50 s
72 °C	5 min

*Amplifikation des Cytochrom c_{550} Fragments (Nco I/Hind III mit Template aus *cycA*)*

Zyklusanzahl	Temperatur	Zeit
1	95 °C	3 min
30	95 °C	30 s
	55 °C	45s
	72 °C	90 s
	95 °C	60 s
1	55 °C	45s
	72 °C	5 min

3.1.9 Präparation von Einzelstrang DNA

Als Ausgangsmaterial für die Mutagenese diente in allen Fällen Einzelstrang-DNA von pAlter_Cyt c_1 (KF)_{WT}. Zur Präparation dieser wurden 2 ml einer Übertagkultur von *E. coli* JM 109 pAlter_Cyt c_1 (KF)_{WT} in 20 ml LB überimpft, für 30 min bei 37 °C geschüttelt und schließlich mit dem Helferphagen R408 (Promega) in einem Verhältnis Phage/Bakterium von 1/10 infiziert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C und 250 rpm. Am nächsten Tag wurde der Phage nach zweimaliger Zentrifugation (20000 rpm, 30 min, 4 °C) mit Phagenpräzipitations-Lösung (3.75 M Ammoniumacetat pH 7.5, 20 % Polyethylenglykol MW 4000) auf Eis gefällt. Das Pellet wurde in H₂O resuspendiert und mit Chloroform/Isoamylalkohol bzw. Phenol/Chloroform extrahiert. Die einzelsträngige DNA konnte daraufhin mit einem halben Volumen 7.5 M Natriumacetat und 2 Volumen Ethanol aus der wässrigen Phase gefällt werden. Das Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen und in 20 µl H₂O aufgenommen.

3.1.10 Mutagenese

Die Mutagenese wurde in allen Fällen mit dem *Altered Sites® II in vitro Mutagenesis System* (Promega) durchgeführt. Die mutagenen Oligonukleotide wurden phosphoryliert und zusammen mit dem Ampicillin-Reparatur-Oligonukleotid und der Einzelstrang-DNA gemäß den Angaben des Herstellers zum Annealing eingesetzt. Nach der Synthese und Ligation erfolgte die Transformation in *E. coli* ES1301 bzw. *E. coli* BMH 71-18 (beides reperaturdefiziente Stämme). Nach einer Plasmidisolierung wurde in *E. coli* JM 109 bzw. *E. coli* DH5 α transformiert. Die aus diesen Stämmen isolierten Plasmide wurden einer Restriktionskartierung unterzogen und anschließend sequenziert. Nach erfolgreicher Sequenzierung wurden die mutagenisierten Cytochrom *c*₁ Konstrukte in pET 22b (+) umklont und in *E. coli* BL21 (DE3) transformiert.

3.1.11 Sequenzierung

Im Rahmen dieser Arbeit kamen zwei unterschiedliche Verfahren zur DNA-Sequenzierung zur Anwendung. Zum einen wurde nach der Methode von Sanger (Sanger *et al.*, 1977), die auf dem Kettenabbruch durch den Einbau (radioaktiv markierter) Didesoxynukleotide basiert, sequenziert. Hierbei kam das ¹⁷Sequencing™ Kit der Firma Pharmacia unter Verwendung von [³⁵S]-dATP zum Einsatz. Zum anderen wurde mit Fluoreszenzmarkierten Nukleotiden unter Verwendung des ABI PRISM® *Big Dye*™ Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) sequenziert, worauf die Amplifikate durch Kapillarelektrophorese am ABI PRISM® Genetic Analyzer 310c (Applied Biosystems) aufgetrennt wurden. Beide Methoden werden im folgenden beschrieben.

3.1.11.1 Radioaktive Sequenzierung

Diese Methode kam bei den Konstrukten pET 22b_Cyt *c*₁ (KF)_{WT} und pET 22b_Cyt *c*₁ (SF)_{WT} zum Einsatz. Die als Ausgangsmaterial dienenden Plasmide wurden, wie in 3.1.1 beschrieben, isoliert, unter Zugabe von NaOH (Endkonzentration 0.2 M) bei 37 °C denaturiert und mit zwei Volumen EtOH gefällt. Die denaturierten Plasmide wurden mit T7 Polymerase und [³⁵S]-dATP und unter Verwendung von Deaza-dGTP sequenziert. Die Reaktion erfolgte hierbei im wesentlichen nach den Angaben des Herstellers (Pharmacia). Die für die Sequenzierung verwendeten Primer sind unter 2.5 aufgeführt. Die Proben wurden auf einem 6 %igem Polyacrylamidgel aufgetrennt, welches daraufhin getrocknet

und zur Exposition unter Lichtabschluss für bis zu drei Tage auf einem Röntgenfilm exponiert wurde. Die Detektion der Signale erfolgte am Durchlichttisch.

3.1.11.2 *Floureszenz-markierte Sequenzierung*

Diese Methode kam bei allen anderen Konstrukten zum Einsatz. Im Falle der Sequenzierung mit dem ABI PRISM[®] *Big Dye*[™] Terminator Cycle Sequencing Kit wurden die Plasmide mit dem *QIAquick*[®] Plasmid Purification Kit (QIAGEN) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Zur Sequenzierung wurden 200 ng Plasmid und 10 pmol Primer eingesetzt. Die Annealing Temperatur des PCR Programms richtete sich nach der Länge und Nukleotidzusammensetzung des Sequenzierprimers. Im Falle von M13_forward/M13_reverse lag sie bei 60 °C, bei T7 Prom/T7 Reverse entsprechend bei 55 °C. Es wurde folgendes PCR Programm verwendet.

Zyklenanzahl	Temperatur	Zeit
25	96 °C	10 s
	50 °C	5 s
	60/55 °C	4 min

Nach der PCR wurden die Terminatoren mit dem *DyeEx*[®] Kit (QIAGEN) nach Angaben des Herstellers entfernt. Die DNA wurde in 20 µl H₂O eluiert und unverdünnt zur Sequenzierung am ABI PRISM[®] Genetic Analyzer 310c (Applied Biosystems) eingesetzt. (Filter Set E, ABI PRISM[®] Collection Software 2.1). Die Analyse der Rohdaten erfolgte mit der ABI PRISM[®] Sequencing Analysis 3.4.1.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Homologe Expression von Cytochrom *bc₁* in *P. denitrificans*

Die Anzucht für Membranpräparationen von *P. denitrificans* erfolgte in 5 Liter Erlenmeyerkolben mit 2.5 Liter Succinat-Medium auf Rundschüttlern (140 rpm, 32 °C), unter der Kontrolle der entsprechenden Antibiotika. Für eine 50 Liter Anzucht wurden zunächst zwei Vorkulturen (200 ml und 1000 ml) angezogen. Die Hauptkultur wurde 2 %ig angeimpft und nach etwa 30 Stunden mit einer Sorvall RC 5B Zentrifuge geerntet. Das vereinigte Sediment wurde in einem geeigneten Volumen 100 mM KP_i pH 8.0 resuspendiert und mit Hilfe einer Manton-Gaulin-Presse unter ständiger Kühlung aufgeschlossen. Dies erfolgte bei 400 bar, wobei die Zellen zuerst unter Druck gesetzt und anschließend durch ein enges Ventil entspannt wurden. Die Zellsuspension wurde daraufhin mit 100 μM Pefabloc SC versetzt, kurz auf Eis inkubiert und über Nacht bei 4 °C und 8000 rpm in einem GS3 Rotor zentrifugiert. Die Pellets wurden vereinigt und mit Hilfe eines Dounce Homogenisators bei 4 °C in 20 mM KP_i pH 8.0 und 1 mM EDTA resuspendiert. Es folgte eine weitere Zentrifugation bei 100000 x g (Beckmann Ultrazentrifuge) für 1 h. Die Membranen wurden bei -80 °C gelagert.

3.2.2 Heterologe Expression von löslichen Cytochromen aus *P. denitrificans* in *E. coli*

3.2.2.1 Expression von löslichen Konstrukten des Cytochrom *c₁*

In Prokaryoten finden sowohl die Synthese des Häms als auch die Translation des Apocytochroms im Cytoplasma statt. Beide Komponenten müssen daraufhin ins Periplasma transloziert werden, da nur dort der Hämeinbau zum funktionsfähigen Enzym stattfinden kann. Im Falle einer erfolgreichen heterologen Überexpression eines aus *P. denitrificans* stammenden *c*-Typ Cytochroms in *E. coli* ist es demnach zum einen notwendig, ausreichende Mengen an Häm und Apocytochrom im Periplasma vorliegen zu haben, zum anderen muss gewährleistet werden, dass die Komponenten (Hilfsenzyme), die den Hämeinbau in *E. coli* ermöglichen, funktionsfähig sind. Es konnte im Vorfeld an einem löslichen Fragment des Cytochrom *c₅₅₂* aus *Paracoccus denitrificans* gezeigt werden, dass die alleinige Transformation eines Expressionsplasmids mit dem Gen für das entsprechende Cytochrom zu keinem befriedigenden Ergebnis in Hinblick auf Ausbeute

und erfolgreichen Hämeinbau bei der heterologen Expression in *E. coli* führt (Reincke, 1996). Durch die Co-Transformation eines weiteren Plasmids (s.u.) konnten die Expressionsraten jedoch signifikant gesteigert werden. Aus diesem Grund wurden bei der heterologen Expression von löslichen Konstrukten des Cytochrom *c*₁ aus *P. denitrificans* die eingesetzten Expressionsstämme (*E. coli* BL21 (DE3) + pET_Cyt *c*₁) zusätzlich mit dem Hämreifungsplasmid pEC 86 (Arslan *et al.*, 1998) transformiert. pEC 86 trägt die Gene *ccmA-H*, welche für die acht Untereinheiten des sog. Maturase-Komplex aus *E. coli* codieren. Der Maturase-Komplex ermöglicht zum einen die Translokation des im Cytoplasma synthetisierten Apocytochroms in das Periplasma und zum anderen die Reduktion dessen Hämbindestelle. Zudem werden die beiden Komponenten (Häm und Cytochrom) durch den Maturase-Komplex in eine den Hämeinbau sterisch begünstigende Konformation zueinander gebracht. Die Gene *ccmA* bis *ccmH* sind in einem Operon organisiert. Die Funktion eines weiteren Reifungsfaktors, CcmI, welcher nicht Teil dieses Operons ist, konnte jüngst zusätzlich aufgeklärt werden (Thöny-Meyer, 2000). Die Untereinheiten CcmA, CcmB und CcmC bilden einen Transporter des ABC-Typs, welcher die Translokation des Apocytochroms ins Periplasma ermöglicht. CcmI ist dem Periplasma zugewandt und ist in der Lage, Apocytochrom zu erkennen und zu binden, während CcmG und CcmH für die Reduktion der Hämbindestelle des Apocytochroms verantwortlich sind. CcmE ist als Häm-Chaperon maßgeblich an der Hämtranslokation beteiligt, ist dabei jedoch von dem Cofaktor CcmD abhängig. CcmC ermöglicht die Bindung des Häms an CcmE. CcmF ist die Häm Lyase (siehe hierzu auch Abbildung 3.1).

Die Funktionen der einzelnen *ccm*-Gene sind in der folgenden Tabelle noch einmal zusammengefasst.

Gen	Funktion
<i>ccmA</i>	ATP-Bindestelle des ABC-Transporters
<i>ccmB</i>	Permease (Translokations-Untereinheit) des ABC-Transporters
<i>ccmC</i>	am Hämexport beteiligt (ermöglicht den Hämeinbau in CcmE)
<i>ccmD</i>	Hilfsfaktor beim Hämeinbau in CcmE
<i>ccmE</i>	Periplasmatisches Häm-Chaperon, bindet Häm kovalent

<i>ccmF</i>	Häm-Lyase, übergibt Häm an das Apocytochrom <i>c</i>
<i>ccmG</i>	Reduktion von CcmH
<i>ccmH</i>	Reduktion der Cytochrome <i>c</i> Hämbindungsstelle
<i>ccmI</i>	Erkennung des Apocytochroms <i>c</i>

Tabelle 3.1: Die Funktion der einzelnen Hämreifungsgene (*ccm* Gene) des Maturase-Komplexes aus *E. coli*. Quelle: Linda Thöny-Meyer, BBA 1459 (2000)

In der folgenden Abbildung sind die einzelnen Untereinheiten des Maturase-Komplexes schematisch dargestellt. Es wird hierbei deutlich, dass die Genprodukte CcmA und CcmB dimerisiert vorliegen und in Abhängigkeit von CcmC die Translokations-Einheit des Hämreifungs-Komplexes bilden.

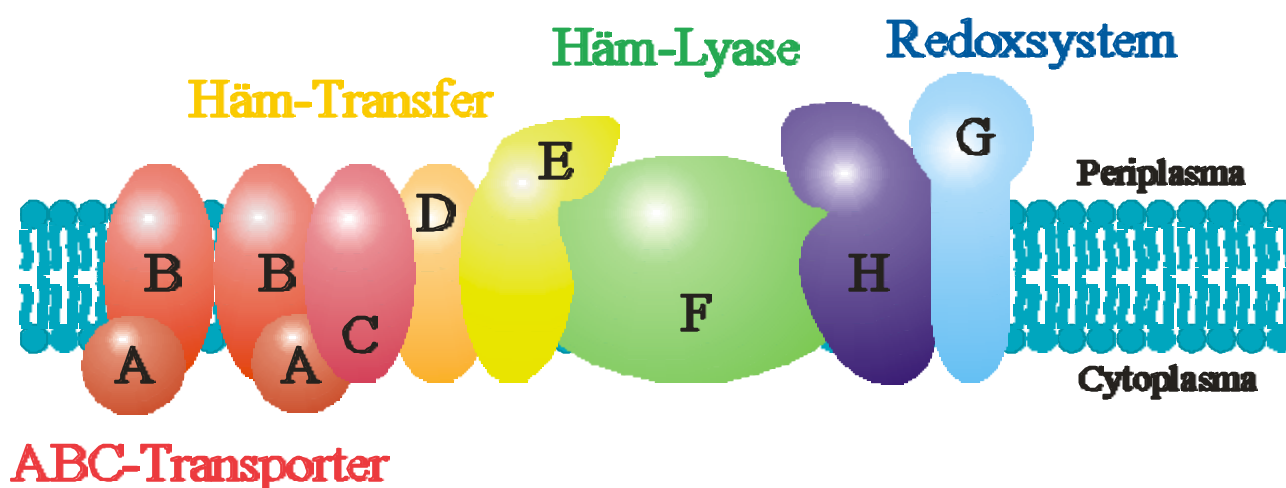


Abbildung 3.1: Der Maturase-Komplex aus *E. coli*. Die acht Genprodukte CcmA-H (hier als A-H bezeichnet) bilden zusammen den Hämreifungs-Komplex in der Membran. Dieser lässt sich funktionell in vier Domänen unterteilen. Die Untereinheiten A, B und C bilden einen Transporter (**ABC-Transporter**) und ermöglichen zusammen mit den Chaperonen D und E die Translokation des Apocytochroms und des Häms aus dem Cytoplasma ins Periplasma (**Häm-Transfer**). G und H ermöglichen die Reduktion der Hämbindestelle (**Redoxsystem**). F ist die Häm Lyase (**Häm-Lyase**). Das Genprodukt CcmI (hier nicht gezeigt) ist ein dem Periplasma zugewandter Faktor, der maßgeblich an der periplasmatischen Erkennung und Bindung des Apocytochroms beteiligt ist (modifiziert nach Linda Thöny Meyer (http://www.micro.biol.ethz.ch/re/re_thoeny/re_lt_cc2.htm)).

Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten rekombinanten Expressionsstämme von *E. coli* BL21 zeigten kein reproduzierbares Expressionsverhalten. Aus diesem Grund musste nach jeder Transformation eine Auswahl Großanzucht-geeigneter Kolonien erfolgen. Diese

Selektion von expressionsfähigen Doppeltransformanden erfolgte in einem zweistufigen Vorgehen. Nach der Co-Transformation von pEC86 in den Expressionsstamm wurde zunächst auf 2 x Amp/2 x Cm Agarplatten ausgestrichen. Am nächsten Tag wurden zehn der gewachsenen Kolonien auf frische 2 x Amp/4 x Cm Platten umgestrichen und erneut über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Hierbei wuchsen in der Regel 4 bis 6 Klone an, mit denen eine Testinduktion durchgeführt wurde. Hierzu wurden 500 µl einer ü.N.-Kultur zu 50 ml frischem Medium (2 x Amp/4 x Cm) gegeben und bei 37 °C im Schüttler bis zu einer $OD_{546} = 1.4$ inkubiert. Die Expression der löslichen Konstrukte des Cytochrom c_1 wurde durch die Zugabe von IPTG induziert. Nach weiteren vier Stunden bei 37 °C wurden die Zellen geerntet. Erschien das Sediment rötlich, wurde dieser Klon für Anzuchten im größeren Maßstab herangezogen. Anzuchten im präparativen Maßstab erfolgten in 5 Liter Erlenmeyerkolben mit 2.5 Liter LB-Medium (2 x Amp/4 x Cm) bei 37 °C in Rundschütteln. Vier Stunden nach dem Induktionszeitpunkt wurden die Zellen auf Eis abgekühlt und in einer Sorval RC 5B Zentrifuge bei 5000 rpm und 4 °C geerntet. Das vereinigte Sediment wurde in einem geeigneten Volumen (12 ml/Liter Kulturmedium) Periplasmapräparations-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 8.0, 500 mM Saccharose, 1 mM EDTA) aufgenommen und stand zur Periplasmapräparation bereit. Zur Steigerung der Expressionsausbeute einer Großanzucht (50 Liter) wurden folgende Parameter in Testanzuchten kleineren Maßstabes verändert:

- Erniedrigung der Anzuchttemperatur auf 32 °C bzw. RT
- Erhöhung der Inkubationszeiträume nach der Zugabe von IPTG (bis zu 16 h)
- Zugabe von bis zu 2 % Glycerin zum Medium
- Zugabe von IPTG zu verschiedenen Zelldichten ($OD_{546} = 0.5-3.0$)
- Variation der IPTG Konzentration (0.4-1.0 mM)
- Zugabe von γ -Aminolävulinsäure (vor/während der Induktion)
- Anzucht in zweifach konzentriertem LB-Medium
- Erniedrigung des Sauerstoffpartialdruckes (semianaerobes Wachstum)

3.2.2.2 Heterologe Expression des löslichen Konstruktes von Cytochrom c_{552}

Im Falle der heterologen Expression des löslichen Fragments von Cytochrom c_{552} musste keine zweistufige Selektion von expressionsfähigen Doppeltransformanden erfolgen, da

hier keine signifikanten Expressionsunterschiede der einzelnen Kolonien bestanden. Zudem war bei den entsprechenden Expressionsstämmen keine Induktion durch IPTG notwendig (siehe auch Reincke, 1996). Die Zellen wurden bei 37 °C und unter der Kontrolle von Ampicillin und Chloramphenicol bis zu einer $OD_{546} = 3.0$ inkubiert, auf Eis abgekühlt und in einer Sorval RC 5B Zentrifuge bei 5000 rpm und 4 °C geerntet.

3.2.2.3 Heterologe Expression des Cytochrom *c*₅₅₀

Die heterologe Expression des löslichen Cytochrom *c*₅₅₀ aus *P. denitrificans* in *E. coli* BL21 (DE3) erfolgte wie die des Cytochrom *c*₅₅₂ konstitutiv, d.h. es war auch hier nicht notwendig, IPTG zuzugeben. Analog zu Cytochrom *c*₅₅₂ wurde bis zu einer Zelldichte von $OD_{546} = 3.0$ angezogen, auf Eis abgekühlt und zentrifugiert.

3.2.3 Periplasmapräparation

Die periplasmatischen Proteine wurden im Rahmen dieser Arbeit in Anlehnung an die Methode von Witholt (Witholt *et al.*, 1976) isoliert.

Die Zellen aus 1 Liter Kulturmedium wurden in 12 ml Periplasmapräparations-Puffer resuspendiert und auf Eis inkubiert. Es erfolgte die Zugabe von Lysozym (60 µg/ml) und Pefabloc SC (2 µg/ml) und eine weitere Inkubation unter Rühren (Magnetrührer) bei 4 °C. Durch die anschließende Zugabe von 1 Volumen eiskaltem H₂O bidest. (osmotischer Schock) konnte das Periplasma schließlich freigesetzt werden. Die Abtrennung der Sphäroplasten erfolgte in der Ultrazentrifuge für 1 Stunde bei 40000 x g und 4 °C. Nach einer erfolgreichen Präparation erschien daraufhin der Überstand rötlich und das Sediment farblos. In Einzelfällen (bei rötlich gefärbten Pellets) wurden diese in einem zweiten Präparationsschritt aufgearbeitet. Hierzu wurde das vereinigte Sediment nach der Ultrazentrifugation erneut in einem geeigneten Volumen Periplasmapräparations-Puffer aufgenommen und unter Verwendung eines Dounce-Homogenisators bei 4 °C resuspendiert. Es folgte erneut ein osmotischer Schock. Erschien die Proteinklösung daraufhin sehr viskos, wurde zusätzlich eine Ultraschall-Behandlung (Branson Sonifier 250; 4 min; Duty Cycle 40 %, Output Control 4) durchgeführt. Dem folgte eine erneute Ultrazentrifugation (30 min, 40000 x g, 4 °C). Der Überstand wurde daraufhin verdünnt und zur Chromatographie eingesetzt.

3.2.4 SDS PAGE nach Laemmli und Schägger

Die löslichen Fragmente des Cytochrom c_1 wurden in der Regel durch 10 %ige Polyacrylamidgele aufgetrennt. Hierbei kamen sowohl SDS-Gele nach Laemmli (Laemmli, 1970) und – aufgrund ihrer besonders guten Auftrennung im niedermolekularen Bereich – vermehrt Tricin-SDS-Gele nach Schägger (Schägger und von Jagow, 1987) zum Einsatz. Im Falle des Cytochrom c_{550} wurden 12-15 %ige Polyacrylamidgele verwendet. Für alle Gele wurde das Mini Protean II System der Firma BioRad benutzt. Im Anschluss an die SDS-PAGE wurden die Polyacrylamidgele mindestens 15 min in Coomassie Blue-Lösung (40 % Methanol (v/v), 10 % Eisessig (v/v), 1 % Coomassie Blue R220 (w/v)) bei 70 °C gefärbt und daraufhin mit Entfärberlösung (40 % Methanol (v/v), 10 % Eisessig (v/v)) bis zur ausreichenden Entfärbung ebenfalls bei 70 °C entfärbt.

3.2.5 Western Blot

Die in einem Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurden unter der Verwendung des Semi-Dry-Blotting Verfahrens (BioRad) auf eine Nitrocellulosemembran (Schleicher und Schüll) übertragen. Es wurde für 1 Stunde bei 400 mA (0.8 mA/cm^2 Gel) transferiert. Anschließend wurde die Membran mit 0.2 % Ponceau S in 3 % TCA angefärbt, um die Effizienz des Transfers beurteilen zu können und um Markerbanden sichtbar zu machen. Es wurde mit H_2O entfärbt und anschließend mit NCS (Newborn Calf Serum, 5 % in TBS) für 1 Stunde abgesättigt. Die Inkubation des ersten Antikörpers (Antikörper „R“, 1:1000 in NCS) erfolgte meist über Nacht. Daraufhin wurde die Membran dreimal mit NCS gewaschen und dann für weitere 3 Stunden mit AAP (Stammlösung 0.05 mg/ml in TBS, 1:1000 in NCS verdünnt) inkubiert. Es folgten mehrere Waschstschritte (10 min NCS, 30 min, 0.5 % Triton X in TBS und 10 min TBS). Danach wurde die Membran für 10 min in TNM äquilibriert und schließlich unter Lichtabschluss mit NBT und BCIP (je 40 μl in 10 ml TMN) angefärbt. Die Reaktion wurde nach ausreichender Anfärbung mit 50 mM EDTA pH 8.0 gestoppt und der Nitrocellulose-Filter zwischen zwei Filterpapieren getrocknet.

Lösungen

TBS	10 mM	Tris/HCl	pH 7.4
-----	-------	----------	--------

	140 mM	NaCl	
	0.05 %	Azid	
<i>TNM</i>	100 mM	Tris/HCl	pH 9.5
	100 mM	NaCl	
	50 mM	MgCl ₂	
<i>NBT</i>	50 mg/ml	Nitroblau-Tetrazolium in 70 % Dimethylformamid	
<i>BCIP</i>	25 mg/ml	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat in Dimethylformamid	

3.2.6 Hämfärbung

Mittels SDS PAGE und anschließender Hämfärbung (Holland *et al.*, 1974, Thomas *et al.*, 1976) des Gels können *c*-Typ Cytochrome nachgewiesen werden. Das Prinzip dieser Färbereaktion beruht auf den Peroxidase-Eigenschaften der Hämgruppen, durch welche 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMBZ) und H₂O₂ zu einem türkisen Niederschlag reagieren. Die Proteinproben müssen hierbei in SDS-Probenpuffer ohne β-Mercaptoethanol aufgenommen werden. Die verwendeten Lösungen sind hier angeführt.

Lösung 1	0.25 M	Natrium-Acetat Puffer pH 5.0
Lösung 2	45 mg	TMBZ in 30 ml Methanol lösen + 70 ml Lösung 1 (entspricht 6.3 mM TMBZ)
Lösung 3	780 µl	H ₂ O ₂ in 30 ml Methanol lösen + 70 ml Lösung 1 (entspricht 60 mM H ₂ O ₂)
Lösung 4	30 ml	Isopropanol + 70 ml Lösung 1

Das Polyacrylamidgel wurde zunächst für 1 Stunde in Lösung 2 inkubiert. Die Färbung erfolgte in Lösung 3 und unter Lichtabschluss. Bei einer ausreichenden Färbung wurde die Reaktion mit Lösung 4 gestoppt.

3.2.7 Säulen-Chromatographie

Die Aufreinigung der löslichen Konstrukte des Cytochrom c_1 aus *P. denitrificans* erfolgte über Anionenaustauscher-Chromatographie und Gelfiltration. Als Ausgangsmaterial diente Periplasma, welches meist unverdünnt, in Einzelfällen auch mit einem Volumen Puffer A versetzt, eingesetzt wurde. Sämtliche Aufreinigungsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt.

Im Falle der Aufreinigung des löslichen Cytochrom c_{550} wurde analog der Aufreinigung des Cytochrom c_1 vorgegangen. Die erste Säule wurde allerdings mit einem Gradienten geringerer Ionenstärke (50 mM bis 350 mM NaCl) eluiert.

Die dabei verwendeten Lösungen sind hier angeführt.

Waschpuffer	50 mM Tris/HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA
Puffer A	50 mM Tris/HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA
Puffer B	50 mM Tris/HCl pH 8.0, 350 mM NaCl, 1 mM EDTA
Puffer C	50 mM Tris/HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA
Hochsalzpuffer	50 mM Tris/HCl pH 8.0, 2 M NaCl, 1 mM EDTA

3.2.7.1 Säule 1: Anionenaustauscher (*Q-Sepharose Fast Flow*)

Die Säule (200 ml Bettvolumen, Durchmesser 2.5 cm) wurde zunächst mit 3-4 Säulenvolumen Waschpuffer äquilibriert. Daraufhin wurde das (verdünnte) Periplasma über einen Stempel auf die Säule aufgetragen und mit 1 Volumen Waschpuffer und 1 Volumen Puffer A von nicht bindenden Verunreinigungen befreit. Die Probe konnte daraufhin durch das Anlegen eines linearen Salzgradienten (150 mM bis 500 mM NaCl) mit einer Laufgeschwindigkeit von ca. 1 ml pro Minute eluiert werden. Die Fraktionsgröße betrug 5 ml. Der Verlauf der Aufreinigung konnte durch die starke Rotfärbung der Proteinlösung ohne UV-Detektion sowohl bereits auf der Säule, als auch anhand der eluierten Fraktionen, verfolgt werden. Zusätzlich wurden die Eluate zur Kontrolle auf ein SDS-Gel aufgetragen und anhand des resultierenden Bandenmusters vereinigt. Die vereinigten Fraktionen wurden auf ein Volumen von max. 5 ml eingengt und standen nun zur Gelfiltration bereit.

3.2.7.2 Säule 2: Gelfiltration (Sephacryl-200)

Auch die Gelfiltrationssäule (200 ml Bettvolumen, Durchmesser 2.5 cm) wurde zunächst mit Waschpuffer äquilibriert. Die Probe wurde aufgetragen, wobei hierbei darauf geachtet wurde, dass die Säule zu max. 1-2 % ihres Volumens beladen wurde. Es wurde mit Waschpuffer eluiert, wobei langsamere Laufgeschwindigkeiten (100 bis 150 μ l pro Minute) grundsätzlich zu einer besseren Auftrennung führten. Die Fraktionsgröße wurde hierbei auf 2 ml reduziert. Nach nochmaliger Überprüfung der Eluate mittels eines SDS Polyacrylamidgels wurden die Fraktionen mit der höchsten Konzentration an Cytochrom c_1 vereinigt und direkt in einer zweiten Anionenaustauscher-Chromatographie (DEAE Sepharose CL-6B) eingesetzt.

3.2.7.3 Säule 3: Anionenaustauscher (DEAE Sepharose CL-6B)

Die dritte Säule hatte ein Bettvolumen von 50 ml bei einem Durchmesser von 1 cm. Auch hier wurde zunächst mit Waschpuffer äquilibriert, dann aufgetragen und mit Waschpuffer und Puffer A gewaschen. Zur Elution wurde ein steilerer Salzgradient (150 mM bis 350 mM NaCl) angelegt. Auch nach dem letzten Aufreinigungsschritt wurde die Reinheit der gesammelten Fraktionen mittels SDS PAGE überprüft.

3.3 Analytische Methoden

3.3.1 Redox-Differenzspektren

Für die Redox-Differenzspektren wurden zum einen Periplasmafraktionen und zum anderen Eluate der verschiedenen Aufreinigungsstufen der löslichen Konstrukte des Cytochrom c_1 eingesetzt. Diese Lösungen wurden hierbei mit Spektrenpuffer (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA) zu einer geeigneten Verdünnung versetzt und in Halbmikroküvetten überführt. Die Proben wurden zunächst mit Kaliumhexacyanoferrat (III) oxidiert und nach Aufnahme eines Spektrums von 500 bis 600 nm durch die Zugabe von Dithionit vollständig reduziert. Der Gehalt am Häm c_1 wurde aus dem Differenzspektrum bei 553 nm mit einem Extinktionskoeffizienten von $\epsilon = 19.4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Chance, 1957) ermittelt. Dieser Extinktionskoeffizient für Cytochrom c bei 550nm kann als eine gute Näherung des bis dato nicht bestimmten Extinktionskoeffizienten für Cytochrom c_1 angesehen werden. Nach dem gleichen Verfahren wurden Redox-Differenzspektren für Cytochrom c_{550} (bei 550 nm) und Cytochrom c_{552} (bei 551.5 nm) aus *P. denitrificans* und Cytochrom c_{551} (bei 551 nm) aus *Ps. aeruginosa* bestimmt. Die Messungen wurden zum einen an einem Kontron Uvicon 941 Photometer und zum anderen an einem Hitachi U3000 Spektrometer durchgeführt.

3.3.2 steady-state-Kinetiken

Es sollte ein spektroskopisches Testsystem entwickelt werden, mit dem der Elektronentransport von (reduziertem) Cytochrom c_1 auf (oxidiertes) Cytochrom c_{552} als *steady-state*-Kinetik detektiert werden kann. Die spektrale Überlappung der beiden zu untersuchenden c -Typ Cytochrome erschwerte dies. In einem ersten Ansatz wurde daher ein gekoppelter Test entwickelt, in dem zum einen die Cytochrom c_1 -Konzentration in 20fachem Überschuss gegenüber der Konzentration an Cytochrom c_{552} gewählt wurde. Zum anderen wurde der Mischung der beiden Reaktionspartner ein Überschuss an Cytochrom- c -Oxidase (COX) zugegeben. COX sollte hierbei als eine Art „Elektronensenke“ fungieren und somit gewährleisten, dass Cytochrom c_{552} auch bei einem großen Überschuss an Cytochrom c_1 weitgehend oxidiert vorliegt. Ziel dieser Messungen war es, eine Ionenstärkeabhängigkeit der Reaktion zwischen Cytochrom c_1 und

Cytochrom c_{552} zu bestimmen. Weiterhin sollten *steady-state*-Kinetiken durchgeführt werden, um Werte für K_M bestimmen zu können. Im Vorfeld einer jeden Messung wurde eine konzentrierte Cytochrom c_1 Lösung mit Dithionit reduziert und mit einer Sephadex G-25 Säule bei 4 °C zur Abtrennung des überschüssigen Reduktionsmittels entsalzt. Die Messungen wurden bei RT an einem Hitachi U3000 Spektrometer vorgenommen. Hierzu wurden COX und Cytochrom c_{552} in einer 1 ml Küvette in Reaktionspuffer (20 mM Tris/HCl pH 7.5, 20 mM KCl, 1 mM EDTA, 0.2 g/l DM) vorgelegt und für ca. 15 s im Strahlengang stehen gelassen, bevor die Reaktion durch die rasche Zugabe von Cytochrom c_1 gestartet wurde. Zur Bestimmung der Wechselzahl verfolgte man $\Delta E/\text{min}$. Die Aufnahme der Reaktion erfolgte bei 553 nm und wurde nach 240 s durch die Zugabe von KCN gestoppt. Es wurden Messpunkte im Bereich zwischen 0.5 und 20 μM Cytochrom c_{552} gewählt. Jeder Messwert wurde 4fach aufgenommen. Die Cytochrom c_1 Konzentration wurde in jeder Messreihe konstant zwischen 50 und 100 μM gehalten. Die Konzentration von Cytochrom aa_3 wurde dabei so gewählt, dass die Oxidase im vielfachen Überschuss vorlag ($> 10 \text{ ng}$) und daher keinen Einfluss auf die Reaktion zwischen den beiden c -Typ Cytochromen nehmen sollte. Zudem wurden Messreihen von Cytochrom c_1 und COX in Abwesenheit von Cytochrom c_{552} als Basislinien aufgenommen, um welche die jeweiligen Messungen nachträglich korrigiert wurden.

3.3.3 Doppelsektor-Küvetten-Experimente

Die im Rahmen dieser Arbeit zu untersuchenden c -Typ-Cytochrome weisen sämtlich ein in der α -Bande überlappendes Redox-Differenzspektrum auf, weswegen sich dieser Wellenlängenbereich (um 550 nm) nicht für die spektroskopische Bestimmung von Redoxübergängen zwischen diesen Proteinen eignete. Aus diesem Grund wurden mittels Doppelsektor-Küvetten-Experimenten (DSK-Experimenten) die Wellenlängen bestimmt, bei denen sich die beiden Redoxpartner unterscheiden lassen. Hierzu wurden ca. 800 μl der jeweiligen Cytochrom c -Lösung in eine Doppelsektor-Küvette gefüllt, ohne dass es zu einer Vermischung der beiden zu untersuchenden Komponenten kam. Es wurde ein Spektrum (400 bis 600 nm) aufgenommen („vor_mix“). Daraufhin wurden die beiden Komponenten durch mehrmalige Invertierung der (zuvor durch einen Deckel verschlossenen) Küvette durchmischt. Es wurden dann im Abstand mehrerer Minuten (z.T. auch Stunden) weitere Spektren aufgenommen („nach_mix“). Aus der Differenz der Spektren („vor_mix – nach_mix“) konnten die Wellenlängen abgelesen werden, bei denen

sich das jeweilige Redoxpaar spektroskopisch differenzieren ließ. Die Konzentration der jeweiligen eingesetzten Cytochrom *c*-Lösungen lag bei ca. 5 μM . Die im DSK-Experiment bestimmten Wellenlängen der jeweiligen Redoxpaare dienten als Grundlage für die Festsetzung der Wellenlänge in der schnellen Kinetik (Single Wavelength Stopped Flow).

3.3.4 pre-steady-state Kinetiken

Die Messungen wurden an der Universität „La Sapienza“ in Rom in Zusammenarbeit mit Prof. Francesco Malatesta an einem thermostatisierten Stopped-Flow-Photometer (Leatherhead, UK) durchgeführt. Die Messungen erfolgten anfangs bei 19.5 °C und einer Ionenstärke von $I = 136 \text{ mM}$ (20 mM Tris/HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 120 mM KCl) und unter dem größtmöglichen Ausschluss von Luftsauerstoff. Im Laufe dieser Arbeit wurde ein weiteres Protokoll entwickelt, dass durch die Erniedrigung der Temperatur auf 3.5 °C eine Erniedrigung der Ionenstärke auf 36 mM erlaubte, ohne dass die Reaktion zu schnell wurde, um sie detektieren zu können. Zur Probenvorbereitung wurde eine konzentrierte Cytochrom *c*₁-Lösung mit Dithionit vollständig reduziert und über eine G25-Säule bei 4 °C von Resten des Reduktionsmittels befreit. Die hierbei verwendeten Puffer wurden zuvor durch die Einleitung von Stickstoff bestmöglich von Sauerstoff befreit. Das reduzierte Cytochrom *c*₁ wurde direkt nach der Elution von der Säule in einem Falcongefäß für weitere 25 min durch eine direkte N₂-Begasung bei Raumtemperatur weitestgehend von möglichen Sauerstoffresten befreit und schließlich in einer 20 ml-Glasspritze mit auf Eis gehaltenem Messpuffer (4 °C) auf eine Konzentration von 5 μM verdünnt und binnen weniger Stunden verbraucht. Es wurden zudem für jede Messung fünf verschiedene Cytochrom *c*₅₅₂-Konzentrationen hergestellt und in 20 ml-Kunststoffspritzen im Kühlschrank aufbewahrt. Für jede Konzentration wurden 3-4 Messungen durchgeführt und gemittelt. Nach jeder Messreihe wurden die tatsächlichen Konzentrationen der beiden *c*-Typ Cytochrome durch Redox-Differenzspektren bestimmt. Aufgrund des biphasischen Kurvenverlaufs wurden die Rohdaten bei der Auswertung durch das Programm matlab 4.0 zum Teil an eine Gleichung mit zwei Exponenten angepasst (siehe Ergebnisse). Die durch das jeweilige Statistikprogramm korrigierten Geschwindigkeiten (k_{obs}) wurden gegen die Cytochrom *c*₅₅₂-Konzentration (after mixing) aufgetragen. Aus der Steigung der daraus resultierenden Kurven lässt sich die bimolekulare Geschwindigkeitskonstante (k_{on}) berechnen. Diese Berechnungen wurden ebenfalls mit dem Programm matlab vorgenommen.

3.3.5 Differentielle Scanning Kalorimetrie

Die Differentiellen Scanning Kalorimetrie-Experimente (DSC-Experimente) zur Analyse der Stabilität des löslichen Kernfragments von Cytochrom c_1 wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Valdimir Rogov (Institut für Biophysikalische Chemie, Universität Frankfurt) an einem geschlossenen, adiabatischen Zwillingskalorimeter (MC2, Fa. Microcal Inc.) durchgeführt. Die beiden Reaktionskammern hatten ein Volumen von jeweils 1.2227 ml. Die Versuche wurden in 20 mM KP_i pH 8.0 vorgenommen. Um einen einheitlichen Redoxzustand zu erreichen, wurde ein geringer Überschuss Natriumdithionit zugesetzt. Um Effekte des Puffers und des darin gelösten Reduktionsmittels auszuschließen, wurden vor jeder Messung Basislinien aufgezeichnet, um welche die Proteinkurven im Rahmen der Auswertung korrigiert wurden. Vor Beginn der Messung wurden die Reaktionskammern mit SDS-Lösung, Millipore-Wasser und Aceton gewaschen und anschließend mit dem Reaktionspuffer äquilibriert. Die Probenzelle wurde mittels einer Hamiltonspritze mit einer Cytochrom-Lösung bekannter Konzentration die Referenzzelle mit Reaktionspuffer befüllt. Die Aufzeichnung der Messkurve erfolgte mit einer Scanrate von 45 °C/h in einem Temperaturbereich von 15 °C bis 90 °C. Die Steuerung der DSC-Messung erfolgte dabei über das MC-2-Programm der Firma Microcal Inc. Es wurden zwei Versuchsreihen mit Cytochrom c_1 (in der reduzierten Form) mit unterschiedlichen Konzentrationen (2 mg/ml und 6.1 mg/ml) durchgeführt. Zusätzlich wurde eine Probe einer äquimolaren Mischung aus oxidiertem Cytochrom c_{552} und reduziertem Cytochrom c_1 eingesetzt.

4. Ergebnisse

Im folgenden Kapitel sind die Ergebnisse der Herstellung und funktionellen Charakterisierung der löslichen Fragmente des Cytochrom c_1 aus *P. denitrificans* sowie der Expression und Charakterisierung anderer in dieser Arbeit verwandten Cytochrome dargestellt. Zur besseren Übersicht wurde dieses Kapitel in zwei Teile untergliedert.

4.1 Expression und Aufreinigung

Die Herstellung der beiden löslichen Fragmente des Cytochrom c_1 stellte den ersten Teil und eine wichtige Voraussetzung für diese Arbeit dar. Die Planung und Herstellung von insgesamt elf Mutanten des Kernfragments schloss sich dem an. Schließlich wurde das lösliche Cytochrom c_{550} aus *P. denitrificans* heterolog in *E. coli* exprimiert.

4.1.1 Konstruktion von pET-Cyt c_1 -KF und pET-Cyt c_1 -SF

Als Ausgangsplasmid für die Klonierung sämtlicher Cytochrom c_1 Fragmente diente ein pSelect-Konstrukt, in welchen das gesamte *fbc*-Operon aus *P. denitrificans* über die Restriktionsschnittstellen *Stu* I/*Nco* I eingebracht worden war (pSelect-*fbc*; Amp^R, Tet^R, Marcus Korn, 1999). Durch einen *Sfi* I/*Hind* III Restriktionsverdau wurde ein Fragment von 3515 bp gewonnen, welches als Matrize für die anschließende PCR diente. Durch die synthetisierten und in der PCR verwandten Primer wurde im Falle des Kernfragments ein Amplifikat von 669 bp, im Falle des sauren Fragments ein Amplifikat von 1170 bp erhalten. Durch die eingebrachten Restriktionsschnittstellen für *Nco* I und *Hind* III konnten die jeweiligen Fragmente in die MCS des Expressionsvektors pET 22b(+) (Novagen) kloniert werden.

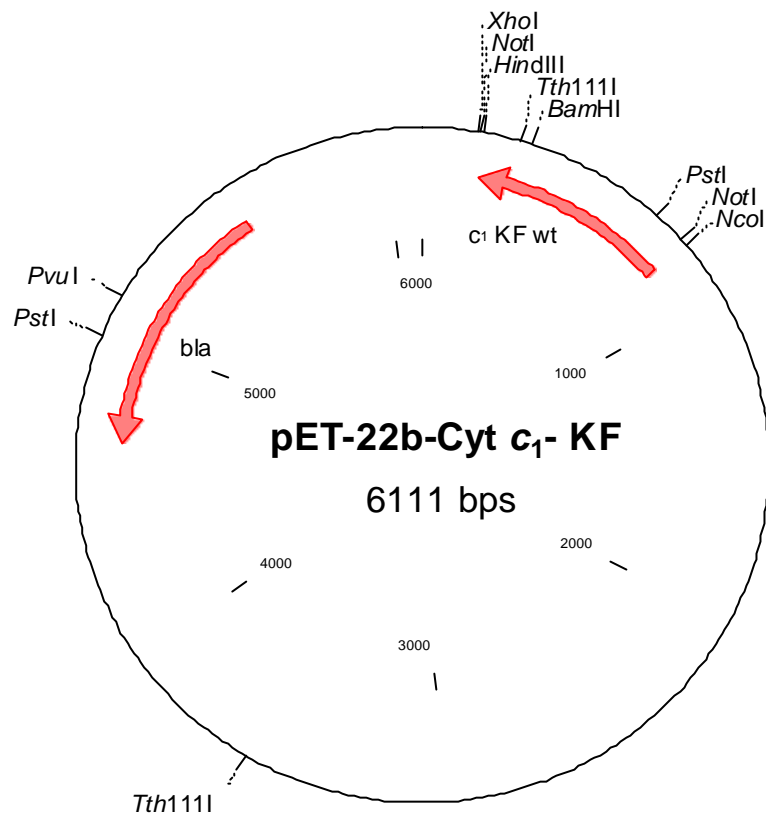


Abbildung 4.1: Plasmidkarte des Konstruktes pET 22b-Cyt c_1 -KF, erstellt mit dem Programm Clone Manager 5.0

Eine Kontrolle der erfolgreichen Klonierung erfolgte durch Restriktionskartierung und DNA-Sequenzierung der erhaltenen Konstrukte. In der folgenden Abbildung ist das Ergebnis einer Restriktionskartierung für die beiden Konstrukte pET-Cyt c_1 -KF und pET-Cyt c_1 -SF gezeigt.

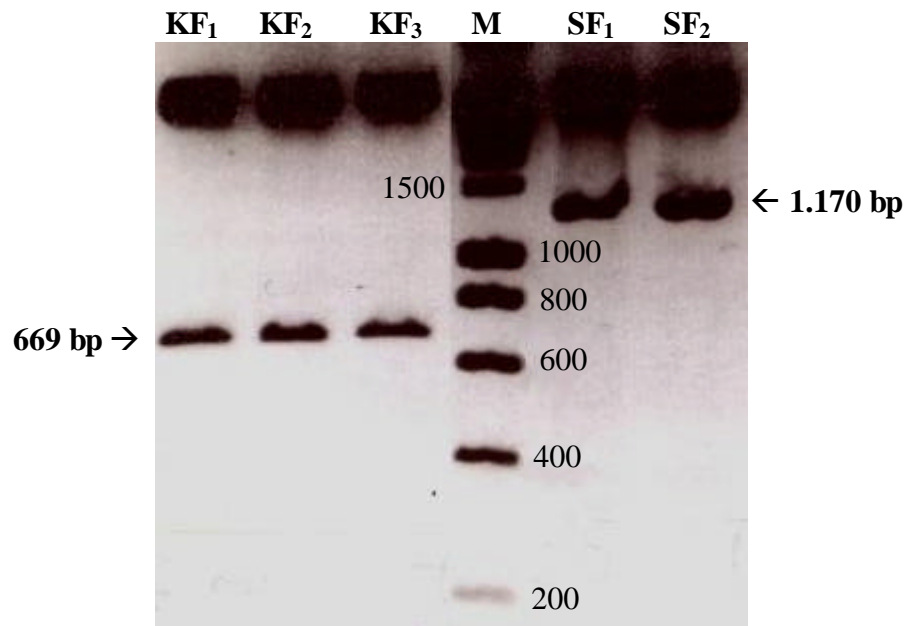


Abbildung 4.2: Restriktionskartierung der beiden Konstrukte pET-Cyt c_1 -KF und pET-Cyt c_1 -SF durch *Nco* I und *Hind* III. Die jeweiligen Restriktionsansätze (KF₁, KF₂ und KF₃ bzw. SF₁ und SF₂) wurden anschließend auf einem 1.5 %igen Agarosegel aufgetrennt. M = Marker. Die Größen der Markerbanden sind in bp angegeben.

4.1.2 Konstruktion von pAlter-Cyt c_1 -KF

Das Konstrukt pAlter-Cyt c_1 -KF diente als Ausgangsplasmid für sämtliche in dieser Arbeit hergestellten Mutanten. Zu seiner Herstellung wurde in die MCS des Mutagenesevektors pAlter™ Ex-1 (Promega) das durch Doppelrestriktion mit *Nco* I und *Hind* III gewonnene Insert des Cytochrom c_1 Kernfragments kloniert. Die Bestimmung positiver Klone erfolgte durch Restriktionskartierung und anschließende DNA-Sequenzierung.

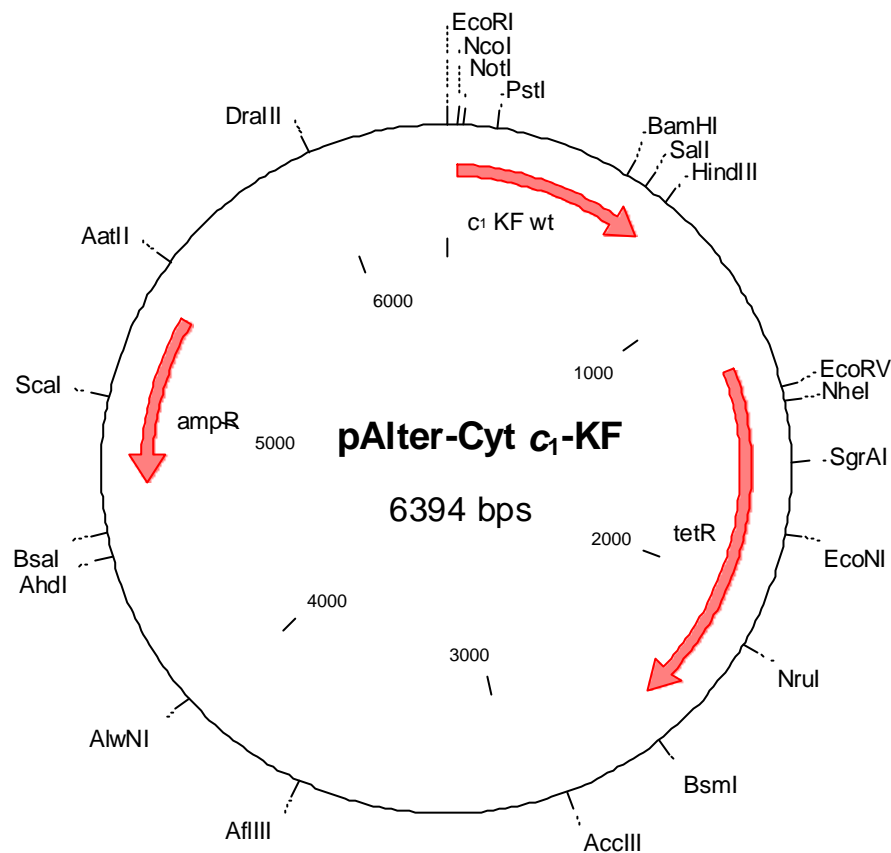


Abbildung 4.3: Plasmidkarte des Konstruktes pAlter-Cyt c_1 -KF

Der in dieser Arbeit verwendete Klon wurde mittels *Big Dye*TM Cycle Sequencing in seiner vollen Insertlänge überprüft.

4.1.3 Konstruktion von pEC-Kan^R

Der vorliegende Hämreifungsvektor pEC86 vermittelt eine Chloramphenicol-Resistenz. Für eine erfolgreiche heterologe Expression hämhaltiger Proteine in *E. coli* war eine Co-Transformation dieses Vektors in den Expressionsstamm (BL21 (DE3)) notwendig. Durch die vorliegende Chloramphenicol-Resistenz konnten hierbei jedoch keine Cm-resistenten Expressionsstämme (wie z.B. BL21 (DE3)_{pLysS}) zur Expression löslicher Fragmente des Cytochrom c_1 verwendet werden, da hierbei keine Selektion positiver Doppeltransformatanten möglich gewesen wäre. Aus diesem Grund wurde beschlossen, den

vorliegenden Hämreifungsvektor zu modifizieren und sein Cm-Resistenzgen durch die Insertion einer Kan^R-Kassette zu inaktivieren.

Als Ausgangsplasmid für diese Klonierung diente hierbei der Vektor p34S-Km3 (Klaus Hoffmeier, 2000), aus dem durch eine präparative Restriktion mit *Sma* I (2 h, 30 °C) ein 1.1 kb Fragment (Kan^R-Kassette) isoliert werden konnte.

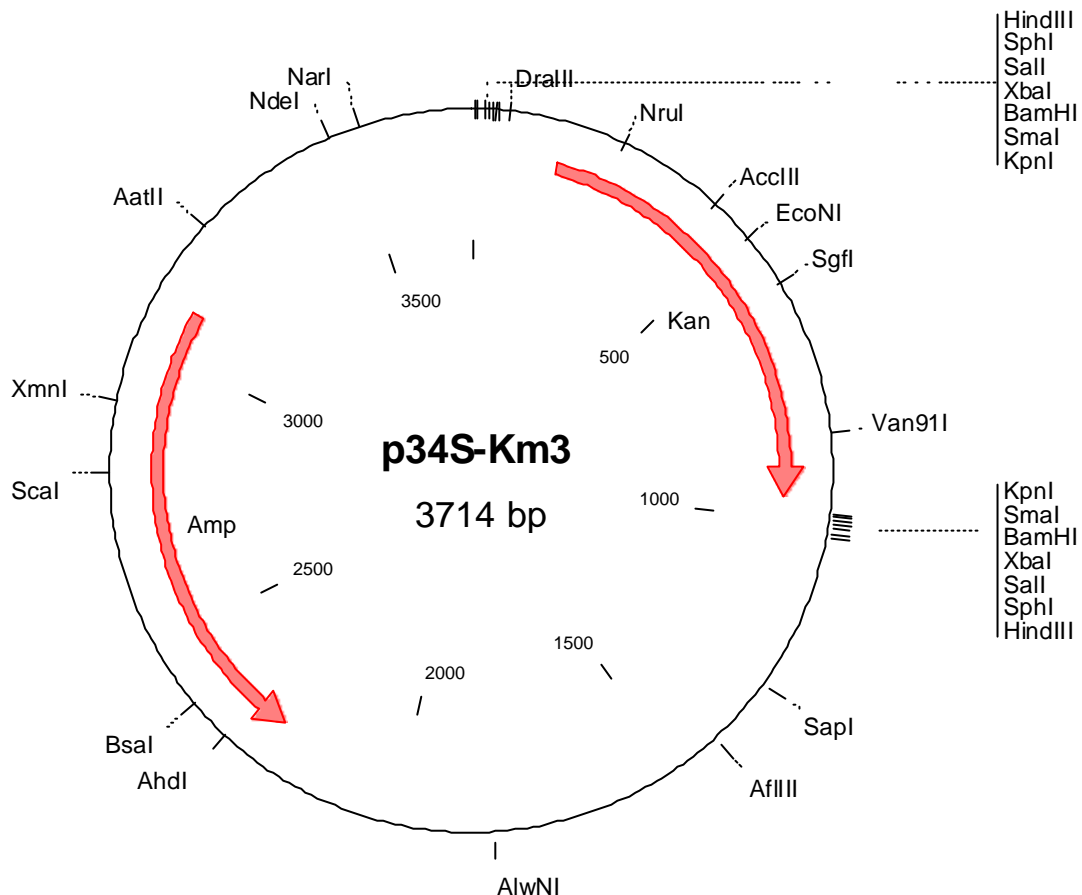


Abbildung 4.4: Plasmidkarte von p34S-Km3

Das Insert stand somit zur blunt-end-Ligation mit dem *Nco* I linearisierten Hämreifungsvektor pEC86 zur Verfügung. Dieser wurde nach dem Verdau mit *Nco* I (1 h, 37 °C) zunächst einer Klenow-Behandlung unterzogen (10 min., 37 °C) und dann zur Ligation eingesetzt. Zur Ligation wurden zusätzlich 1/10 Volumen PEG 400 zugegeben. Nach zweistündiger Ligation und anschließender Transformation in *E. coli* BL21 (DE3) wurde auf Kanamycin ausplattiert. Die Bestimmung positiver Klone erfolgte durch Restriktionskartierung mit *Kpn* I (1.1 kb Fragment).

Das erhaltene Plasmid wurde in die Expressionsstämme BL21 (DE3)_pLysS und BL21 (DE3)_CodonPlus^{RIL} (+ pET_Cyt *c*₁ (KF)) transformiert, woraufhin eine Selektion expressionsfähiger Stämme durch Amp, Cm und Kan erfolgte. Nach einer Testinduktion in kleinem Maßstab und anschließender Präparation (siehe 3.2.5) wurde die Expressionsausbeute anhand von Redox-Differenzspektren des Periplasmas ermittelt. Die Ausbeute an löslichem Cytochrom *c*₁ konnte jedoch auch nach der Variation mehrere Parameter bei der Testinduktion nicht signifikant gegenüber dem Expressionssystem BL21 (DE3) + pET/pEC86 gesteigert werden (~ 5 mg Cytochrom *c*₁/Liter Kulturmedium). Aus diesem Grund wurde der Versuchsansatz an dieser Stelle nicht weiter verfolgt.

4.1.4 Konstruktion von pET-Cyt *c*₅₅₀

Im Verlauf dieser Arbeit wurde beschlossen, Cytochrom *c*₅₅₀ aus *P. denitrificans* als Kontrollprotein im Rahmen kinetischer Messungen einzusetzen. Aus diesem Grund wurde ein Plasmid konstruiert, welches die heterologe Expression von *P. denitrificans* Cytochrom *c*₅₅₀ in *E. coli* ermöglicht. Als Ausgangsplasmid diente hierbei pUC19-*cycA* (van Spanning, 1984). Das *cycA*-Gen konnte hieraus durch eine Doppelrestriktion mit *Eco* RI/*Hind* III gewonnen werden. Die anschließende PCR ergab ein 300 bp Fragment, welches durch die eingefügten Schnittstellen für *Nco* I und *Hind* III in einen geöffneten pET 22b(+) Vektor eingebracht werden konnte. Nach anschließender Transformation in *E. coli* JM 109 wurde durch Restriktionskartierung ein positiver Klon identifiziert. Das erhaltene Konstrukt pET_Cyt *c*₅₅₀ wurde schließlich in *E. coli* BL21 (DE3) transformiert.

4.1.5 Mutagenese

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Punktmutationen in die Aminosäuresequenz des löslichen Kernfragments des Cytochrom *c*₁ aus *P. denitrificans* eingeführt. Die aufgeführten mutagenen Oligonukleotide wurden hierbei – wenn möglich – so konstruiert, dass die erfolgreiche Einführung einer Mutation durch eine zusätzliche/deletierte Restriktionsschnittstelle nachgewiesen werden konnte. Hierzu wurde das Programm „The Primer Generator“ eingesetzt (siehe dazu <http://www.med.jhu.edu/medcenter/primer/primer.cgi>).

Eine grundlegende Fragestellung dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung der Interaktion zweier *c*-Typ Cytochrome aus *P. denitrificans* und der weitergehenden

Frage, ob es sich hierbei um eine elektrostatische Wechselwirkung handelt. Dazu war es notwendig, exponierte, geladene einzelne Aminosäuren zu definieren und zu untersuchen, ob diese maßgeblich an der Wechselwirkung zwischen Cytochrom c_1 und Cytochrom c_{552} beteiligt sind. Aus diesem Grund wurden gezielt saure Aminosäureseitenketten auf dem Cytochrom c_1 (Kernfragment) ausgewählt und mutiert. Die Beseitigung der negativen Ladungen erfolgte hierbei durch den Austausch von Glutamat oder Aspartat zu den jeweiligen Amidderivaten bzw. zu Lysin.

Die Mutagenese wurde in allen Fällen mit dem *Altered Sites® II in vitro Mutagenesis System* (Promega) durchgeführt. Alle Konstrukte wurden zunächst einer Doppelrestriktion mit *Nco* I und *Hind* III unterzogen. Erfolgte hierdurch eine Detektion des 669 bp Einschubs, wurden die mutierten Fragmente in pET 22b(+) umkloniert und nach erfolgter Transformation in *E. coli* JM 109 sequenziert. Im Falle von E243K, E354Q, E354K, E355Q und E355K konnte die Einführung der gewünschten Mutation durch eine zusätzliche Restriktionskartierung überprüft werden. Durch die Mutation zu E243K wurde eine zusätzliche Schnittstelle für *Sty* I eingeführt. Im Falle von E354 und E355 führte die Mutation des Glutamats zu Glutamin bzw. Lysin zu der Deletion einer *Ear* I Schnittstelle.

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die erwarteten Fragmentgrößen nach erfolgter Restriktionskartierung.

Mutante	Restriktionskartierung	Fragmentgrößen Wildtyp [in bp]	Fragmentgrößen Mutante [in bp]
E243K	Insertion einer <i>Sty</i> I Schnittstelle	3891, 1400, 731, 300	3891, 1400, 731, 170, 130
E354Q, E354K	Deletion einer <i>Ear</i> I Schnittstelle	2551, 1899, 944, 374, 454, 200	2551, 1800, 944, 654, 374
E355Q, E355K	Deletion einer <i>Ear</i> I Schnittstelle	2551, 1899, 944, 374, 454, 200	2551, 1800, 944, 654, 374

Tabelle 4.1: Restriktionskartierung der Konstrukte E243K, E354Q, E354K, E355Q und E355K. Durch gezieltes Primerdesign konnte die erfolgreiche Einführung einer Mutation durch eine zusätzliche/deletierte Restriktionsschnittstelle nachgewiesen werden. Die Fragmentgrößen des Wildtyps sind im Vergleich zu den Mutanten dargestellt.

In der folgenden Abbildung ist das Ergebnis einer Restriktionskartierung, exemplarisch an pAlter_Cyt *c*₁ E243K, gezeigt.

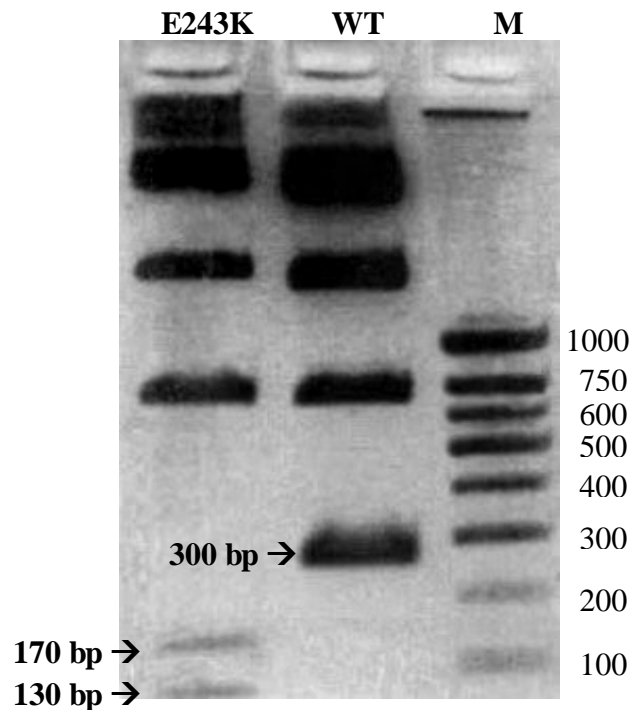


Abbildung 4.5: Restriktionskartierung des Kontruktes pAlter Cyt *c*₁ E243K durch *Sty* I. Die jeweiligen Restriktionsansätze (E234K und WT) wurden anschließend auf einem 1.5 %igen Agarosegel aufgetrennt. Zusätzlich wurde ein kommerzieller DNA Marker (M) mit aufgetragen.

Nach erfolgreicher Sequenzierung wurden die mutagenisierten Plasmide in *E. coli* BL21 (DE3) transformiert und in einem zweiten Schritt mit pEC86 transformiert.

In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse der Herstellung sämtlicher Konstrukte noch einmal zusammengefasst.

Cyt c_1 Mutante	Identifikation der Mutation durch:	Erhaltene Fragmente [bp]	Ergebnis Restriktion	Ergebnis Sequenzierung	Expression in <i>E. coli</i>
E243Q		nicht möglich		positiv	positiv
E243K	zusätzliche <i>Sty</i> I Schnittstelle	3891, 1400, 731, 170, 130	positiv	positiv	positiv
N287D	zusätzliche <i>Sac</i> II Schnittstelle	6394	positiv	positiv	positiv
D283N		nicht möglich		positiv	positiv
D349K		nicht möglich		positiv	positiv
D349N		nicht möglich		positiv	negativ
E351Q		nicht möglich		negativ	negativ
E351K		nicht möglich		positiv	positiv
E352Q		nicht möglich		negativ	negativ
E352K		nicht möglich		positiv	positiv
E354Q	Deletion einer <i>Ear</i> I Schnittstelle	2551, 1800, 944, 654, 374	positiv	positiv	positiv
E354K	Deletion einer <i>Ear</i> I Schnittstelle	2551, 1800, 944, 654, 374	positiv	positiv	positiv
E355Q	Deletion einer <i>Ear</i> I Schnittstelle	2551, 1800, 944, 654, 374	positiv	positiv	positiv
E355K	Deletion einer <i>Ear</i> I Schnittstelle	2551, 1800, 944, 654, 374	positiv	positiv	positiv

Tabelle 4.2.: Zusammenfassung der Ergebnisse der Herstellung sämtlicher pAlter Konstrukte.

Die beiden Mutationen D351Q und D352Q ließen sich nicht ohne *second-site* Mutationen herstellen. Der auf molekulargenetischer Ebene positive Klon D349N ließ sich auch unter der Veränderung mehrerer Parameter in *E. coli* nicht erfolgreich zur Expression bringen.

4.1.6 Homologe Expression von *bc₁* (*Dacid_fbc*) in *P. denitrificans*

Das Cytochrom *c₁* Genprodukt von *P. denitrificans* unterscheidet sich durch eine ca. 150 AS lange N-terminale Extensionsdomäne von dem anderen Cytochrom *bc₁*-Komplexe. Es wird allgemein postuliert, dass diese Domäne aufgrund ihrer extrem sauren Aminosäurezusammensetzung maßgeblich an einer elektrostatischen Wechselwirkung zwischen Cytochrom *c₁* und seinem Redoxpartner, dem Cytochrom *c₅₅₂*, beteiligt ist. Ein Nachweis über den tatsächlichen Einfluß dieser sauren Domäne bei der Wechselwirkung mit seinem Redoxpartner war eine maßgebliche Fragestellung dieser Arbeit. Ein Versuchsansatz waren vergleichende kinetische Untersuchungen zwischen *P. denitrificans* Wildtyp *bc₁* und einem deletierten *P. denitrificans bc₁*-Komplex, in dem die saure Domäne durch eine „in-frame“-Deletion innerhalb des *fbc*-Operons deletiert worden war. Als Ausgangsplasmid diente hierbei pEG471 (Ernst Gerhus, 1990), welches durch ein triparentales Mating in den Deletionsstamm MK6 (Marcus Korn, 1996) eingebracht wurde. Bei diesem Deletionsstamm ist das gesamte *fbc*-Operon deletiert. Nach dem triparentalen Mating wurden positive Klone auf Rif-Sm-Kan-Platten selektiert und angezogen. Die Membranspektren der anschließenden Präparation ergaben, dass der deletierte *bc₁*-Komplex in MK6 exprimiert und erfolgreich assembliert worden war (Daten nicht gezeigt).

4.1.7 Heterologe Expression von *P. denitrificans* Cytochrom *c₁* in *E. coli*

Die verschiedenen löslichen Konstrukte des Cytochrom *c₁* aus *P. denitrificans* zeigten ein sehr unterschiedliches Expressionsverhalten. Grundsätzlich exprimierte der Wildtypstamm AE2 (Kernfragment) besser als der Wildtypstamm AE4 (saures Fragment). Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Versuche unternommen, die Expressionsraten beider Stämme zu optimieren.

Zur Expression wurden die erhaltenen Konstrukte in *E. coli* BL21 (DE3) transformiert. Die erhaltenen Stämme (BL21-pET-Cytc₁-KF/SF) wurden anschließend mit dem Hämreifungspasmid pEC86 transformiert. Die Selektion der Doppeltransformanten (Cm^R/Amp^R) erfolgte durch die Zugabe von Antibiotika. Hierbei erwies sich ein zweistufiges Selektionsprinzip als besonders erfolgreich. So wurden die Zellen nach der zweiten Transformation zunächst auf LB-Agarplatten mit einer Antibiotikakonzentration von 60 µg/ml Chloramphenicol und 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei

37 °C inkubiert. Zehn der erhaltenen Kolonien wurden am nächsten Tag auf LB-Agarplatten mit einer höheren Konzentration an Chloramphenicol umgestrichen (120 µg/ml Cm und 100 µg/ml Amp). Eine weitere Inkubation über Nacht ergab zwischen 3-6 positiven Klonen. Die aus dieser zweiten Selektion hervorgegangenen Kolonien zeigten meist ein reproduzierbares Expressionsmuster. Die Expressionsausbeute wurde anhand von Redoxdifferenzspektren (Gehalt an Häm), SDS PAGE (Expressionsmuster während der Anzucht) und Western Blot (Nachweis des Proteins) untersucht. Die Induktion der Expression erfolgte durch die Zugabe von IPTG zum Kulturmedium. Versuche mit Induktionszeitpunkten zu unterschiedlichen Zelldichten konnten zeigen, dass der optimale Induktionspunkt für eine erfolgreiche heterologe Expression löslicher Fragmente des Cytochrom *c*₁ aus *P. denitrificans* in *E. coli* bei OD₅₄₆ = 1.2 bis 1.4 liegt. Nach einer Induktionsdauer von 4 Stunden bei 37 °C hatten die Zellen ihre maximale Expressionsausbeute erreicht. Die Zugabe von Glycerin (1-2 %) zum Kulturmedium hatte keinen nennenswerten Einfluss auf die Ausbeute, die Zugabe von γ-Aminolävulinsäure hingegen konnte die Expressionseffizienz des Kernfragments geringfügig steigern, nicht jedoch die des sauren Fragments. Die Variation der IPTG Konzentration hatte ebenfalls einen Einfluss auf eine erfolgreiche Expression. Konzentrationen unter 0.4 mM im Kulturmedium führten zu signifikant schwächeren Ausbeuten, Konzentrationen über 0.4 mM jedoch zu keiner weiteren Steigerung. Aus diesem Grund wurde diese Menge an IPTG standardmäßig im Protokoll verwendet. Dieses Ergebnis deckt sich sehr gut mit den Angaben des Herstellers. Bei der Anzucht von WT Kernfragment wurde weiterhin eine Versuchsreihe unter Erniedrigung des Sauerstoffpartialdruckes durchgeführt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass sich das lösliche Fragment des Cytochrom *c*₁ unter semianaeroben Bedingungen in *E. coli* nur äußerst ineffizient (Ausbeuten < 0.1 mg/Liter Kulturmedium) heterolog exprimieren ließ. In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Anzuchttemperatur gesenkt. Es zeigte sich, dass sich das WT Kernfragment und einige Mutanten bei 37 °C am erfolgreichsten und reproduzierbarsten exprimieren lassen, während das saure Fragment bei 32 °C zwar ein langsames Wachstum, jedoch eine effizientere Expression aufwies. Eine weitere Senkung der Temperatur auf RT hatte keinen weiteren positiven Einfluss auf das Translationsverhalten der Zellen. Zudem zeigten einige Mutanten (E354Q, E354K, E352K und D283N) bei 32 °C eine reproduzierbarere Synthese. Weiterhin wurden mit dem löslichen Kernfragment Studien in zweifach konzentriertem LB-Medium durchgeführt. Es zeigte sich, dass diese Erhöhung der

Nährstoffkonzentration keinen Einfluss auf die Effizienz des erfolgreichen Einbaus der prosthetischen Gruppe oder die Expressionsausbeute der Zellen hatte, wohl aber auf die Verdopplungszeit der Zellen. Aus diesem Grund wurde zweifach konzentriertes LB-Medium z.T. für die Vorkulturen, nicht aber in den Hauptkulturen verwendet. Allgemein war zu beobachten, dass die Kulturen nach Zugabe von IPTG ihre optische Dichte nicht mehr maßgeblich veränderten. Ein solches Verhalten deckt sich ebenfalls mit den Angaben des Herstellers des Expressionssystems. Zusammenfassend ließ sich die Expressionsausbeute nicht über 9 mg/Liter Kulturmedium steigern.

Ausgehend von den Standardbedingungen (Induktion der Zellen bei $OD_{546} = 1.2$ bis 1.4 mit 0.4 mM IPTG, Ernte nach 4 h) sind die Effekte auf die Ausbeute der beiden Wildtyp-Expressionsstämme AE2 und AE4 durch die verschiedenen Variationsmöglichkeiten bei der Anzucht in folgender Tabelle schematisch zusammengefasst:

Zusätzliche Expressionsbedingung	Effekt auf Ausbeute der Expression von AE2 (KF)	Effekt auf Ausbeute der Expression von AE4 (SF)
Zugabe Glycerin (1-2 %)	kein Effekt	kein Effekt
Zugabe γ -Aminolävulinsäure	Steigerung um 5 %	kein Effekt
semianaerobe Anzucht	Abnahme um 99.9 %	nicht durchgeführt
Anzucht bei 37 °C	Standardbedingung	Abnahme um 15 %
Anzucht bei 32 °C	Abnahme um 10 %	Standardbedingung
Anzucht bei RT	Abnahme um 25 %	Abnahme um 10 %
Anzucht in 2 x LB	kein Effekt	nicht durchgeführt

Tabelle 4.3: Zusammenfassung der Effekte verschiedener Expressionsbedingungen auf die Expressionsausbeuten der beiden Wildtypstämme AE2 und AE4

4.1.8 Aufreinigung der löslichen Fragmente des Cytochrom c_1 (KF/SF)

4.1.8.1 Aufreinigung des Kernfragments von Cytochrom c_1

Die Aufreinigung der löslichen Fragmente des Cytochrom c_1 aus *P. denitrificans* erfolgte über Anionenaustauscher-Chromatographie und Gelfiltration. In der Regel lag das Protein nach der dritten Säule hinreichend sauber vor.

Die folgenden Abbildungen sollen exemplarisch die Aufreinigung des löslichen Kernfragments dokumentieren.

Es wurde zunächst eine Anionenaustauscher-Chromatographie (Q Sepharose Fast Flow) mit verdünntem Periplasma durchgeführt. Die Säule wurde nach dem Beladen mit einem Volumen Waschpuffer (50 mM NaCl) und anschließend einem Volumen Puffer A (150 mM NaCl) gewaschen. Zur Elution wurde daraufhin ein linearer Gradient von 150 mM bis 500 mM NaCl angelegt. Der Verlauf der Aufreinigung konnte hierbei durch die starke Rotfärbung der Proteinlösung ohne UV-Detektion bereits auf der Säule verfolgt werden. Das Totvolumen der Apparatur (Ausgang Gradientenmischer bis Eingang Fraktionssammler) betrug ca. 220 ml. Unmittelbar nach dem Beginn der Elution des Proteins aus dem Gelbett wurden Fraktionen zu 5 ml aufgefangen. Eine Anfärbung der Eluate war ab Fraktion 16 erkennbar. Der Verlauf der Elution ist in Abbildung 4.6 dargestellt.

Fraktionen 5 10 15 18 20 22 24 26 28 30 32 34 36 38 M

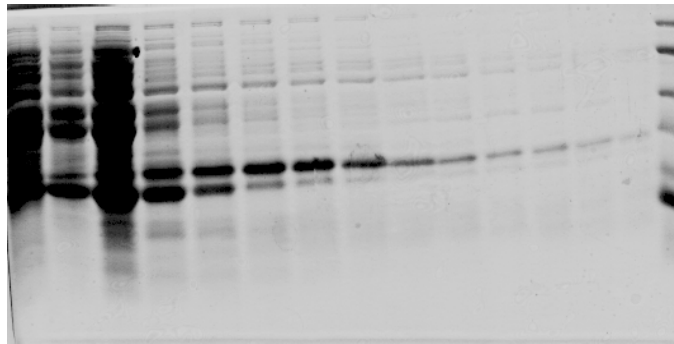


Abbildung 4.6: Aufreinigung des Cytochrom c_1 Kernfragments durch Anionenaustauscher-Chromatographie (Q Sepharose Fast Flow). SDS PAGE (Coomassie-gefärbt) der Eluatfraktionen 12-38 nach Elution mit einem linearen Salzgradienten (150 mM bis 500 mM), M = Marker.

Das Gesamtvolumen des Gradienten betrug in diesem Versuch 250 ml. Die Eluatfraktionen wurden anhand des resultierenden Bandenmusters vereint.

Die vereinten Fraktionen wurden auf ein Volumen von maximal 5 ml eingeeengt und auf eine Gelfiltrations-Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte hierbei mit Waschpuffer. Auch in diesem Fall wurden mit Beginn der Elution des Proteins aus dem Gelbett Fraktionen zu 2 ml im Fraktionssammler aufgefangen. Eine Anfärbung der Eluate war hierbei ab Fraktion 7 erkennbar.

Zur Überprüfung der Reinheit wurden die Fraktionen 7-29 auf ein SDS Polyacrylamidgel aufgetragen. Der Elutionsverlauf ist in Abbildung 4.7 dargestellt.

Fraktionen 7 9 11 13 15 17 18 19 20 21 23 26 27 29 M

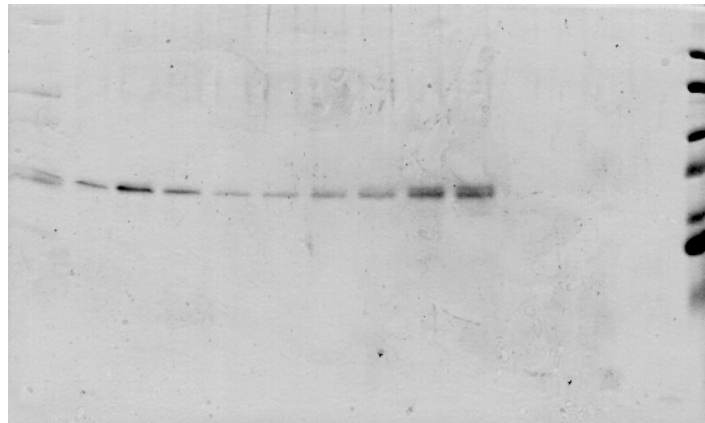


Abbildung 4.7: Weitere Aufreinigung des Cytochrom c_1 Kernfragments durch Gelfiltration. Hierzu wurden die vereinigten Fraktionen der ersten Säule aufgetragen und mit Waschpuffer eluiert. SDS-PAGE (Coomassie-gefärbt) der Elutionsfraktionen 7-29. M = Marker.

Anhand des SDS-Gels wurden die Fraktionen 9-22 vereinigt und direkt einer zweiten Anionenaustauscher-Chromatographie (DEAE Sepharose CL-6B) unterzogen. Hierbei wurde ein steilerer Gradient (150 mM bis 350 mM NaCl) gewählt. Zudem war das Gelbettvolumen auf 50 ml verringert. Unmittelbar nach dem Anlegen des Gradienten wurden Fraktionen zu 2 ml gesammelt. Auch hier wurden die rotgefärbten Fraktionen zur Kontrolle auf ein SDS Polyacrylamidgel aufgetragen. Die erste sichtbar rot gefärbte Fraktion wurde hierbei mit 1 bezeichnet. Der Verlauf der Aufreinigung durch die dritte Säule ist in folgender Abbildung gezeigt.

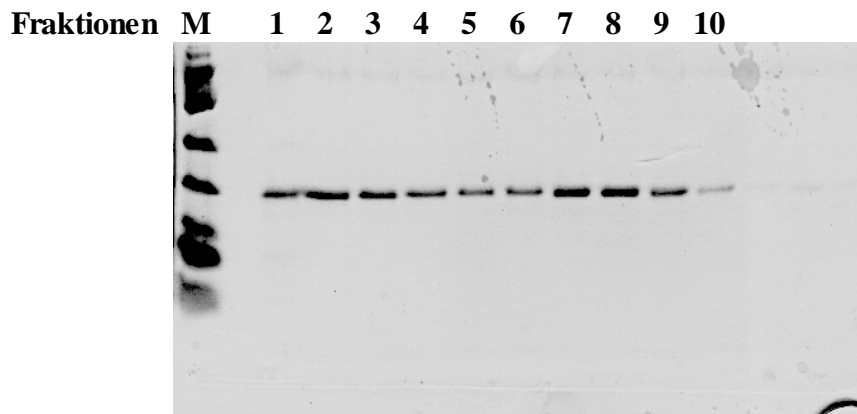


Abbildung 4.8: Aufreinigung des Cytochrom c_1 Kernfragments durch eine weitere Anionen-austauscher-Chromatographie (DEAE Sepharose CL-6B). SDS PAGE (Coomassie-gefärbt) der Eluatfraktionen 1-10 nach Elution mit einem linearen Salzgradienten (150 mM bis 350 mM), M = Marker

Daraufhin wurden die Fraktionen 1-10 aus Abbildung 4.8 vereinigt, auf ein Volumen von 500 μ l eingeeengt und bei -20 °C gelagert.

4.1.8.2 Aufreinigung des sauren Fragments von Cytochrom c_1

Bei der Aufreinigung des sauren Fragments des Cytochrom c_1 aus *P. denitrificans* wurde analog der Aufreinigung des Kernfragments vorgegangen. Das Periplasma wurde zunächst auf eine Q Sepharose-Säule aufgetragen und mit einem Gradienten von 350 mM bis 1 M NaCl eluiert. Das Protein erschien nach der ersten Chromatographie bereits in einem hohen Aufreinigungsgrad, was auf die effizienten Bindeeigenschaften der sauren Domäne an das Säulenmaterial zurückzuführen ist. Im Anschluss an die Q Sepharose-Säule wurde in der Regel noch eine Gelfiltration (Sephacryl) durchgeführt.

4.1.9 Heterologe Expression von *P. denitrificans* Cytochrom c_{550} in *E. coli*

Bei der heterologen Expression des löslichen Cytochrom c_{550} aus *P. denitrificans* in *E. coli* BL21 (DE3) unter Verwendung des pET Expressionssystems (Novagen) zeigte die Zugabe von IPTG (zu dem vom Hersteller angegeben Induktionszeitpunkt von $OD_{546} = 0.5$ bis 1.0) keinerlei Effekt auf die Proteinausbeute. Unter den Standardbedingungen für die Expression des löslichen Cytochrom c_1 (37 °C, LB, Cm, Amp) konnte bei konstitutiver Expression bis zu einer Zelldichte von $OD_{546} = 3.0$ angezogen werden. Diese starke Basalexpression ließ sich auch durch eine IPTG-Zugabe zu späteren Induktionszeitpunkten (bis $OD_{546} = 2.5$) nicht steigern. Die Ausbeute dieser konstitutiven Expression war mit

15mg/Liter Kulturmedium ausreichend. Aus diesem Grund wurden an dieser Stelle keine zusätzlichen Versuche zu einer weiteren Optimierung der Proteinausbeute angestrebt.

4.1.10 Aufreinigung des Cytochrom c_{550}

Das lösliche Cytochrom c_{550} konnte bereits durch die Periplasma-Präparation in hohem Maße aufgereinigt werden. Die folgende Abbildung zeigt ein SDS Polyacrylamidgel einer Sediment- und einer Überstandfraktion nach der Periplasma-Präparation.

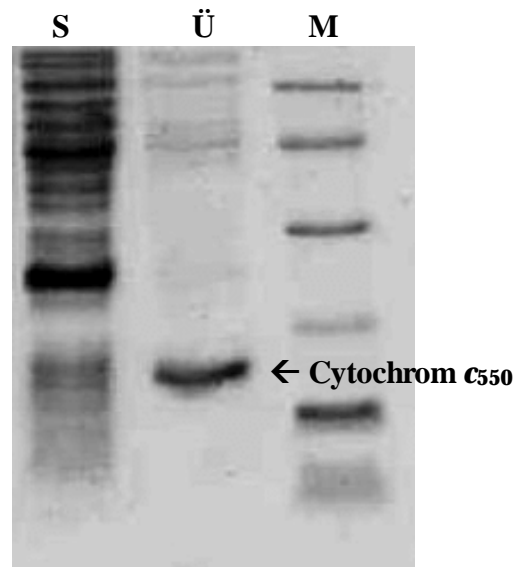


Abbildung 4.9: SDS PAGE (Coomassie-gefärbt) einer Sediment- und einer Überstandfraktion nach Periplasma-Präparation. S= Sediment, Ü = Überstand, M = Marker

Nach der Periplasma-Präparation wurde der intensiv rot gefärbte Überstand mit einem Volumen Waschpuffer verdünnt und auf eine Anionenaustauscher-Säule (Q Sepharose Fast Flow) aufgetragen. Aufgrund der im Vergleich zum Cytochrom c_1 geringeren negativen Ladung des Cytochrom c_{550} wurde für die Elution hier ein Gradient von 50 mM bis 350 mM NaCl gewählt. Durch die starke Rotfärbung der Proteinlösung konnte auch hier der Verlauf der Aufreinigung ohne UV-Detektion bereits auf der Säule verfolgt werden. Die Eluate wurden zur Kontrolle auf ein 15 %iges SDS Gel aufgetragen und anhand des resultierenden Bandenmusters vereint. Das lösliche Cytochrom c_{550} lag bereits nach der 1. Säule hinreichend aufgereinigt vor.

4.2 Funktionelle Charakterisierung

4.2.1 Untersuchungen im *steady-state*-Bereich

Wie bereits in 3.3.2 beschrieben sollte ein spektroskopisches Testsystem entwickelt werden, mit dem der Elektronentransport von (reduziertem) Cytochrom c_1 auf (oxidiertes) Cytochrom c_{552} nachgewiesen und quantifiziert werden kann. Hierbei wurde Cytochrom- c -Oxidase (COX) zugegeben, um zu gewährleisten, dass Cytochrom c_{552} während der gesamten Messung und auch bei den im Überschuss vorliegenden Konzentrationen an Cytochrom c_1 überwiegend oxidiert vorlag. Es wurden Extinktionsveränderungen bei 553 nm und verschiedenen Ionenstärken bestimmt und daraus die Wechselzahl der jeweiligen Reaktion berechnet. Die Auftragung der gemessenen Werte ergab einen glockenförmigen Kurvenverlauf. Es konnte für jedes der beiden Cytochrom c_1 Fragmente (KF und SF) ein eigenes Ionenstärkeoptimum bestimmt werden. Für das Minimalfragment lag dieses bei 26 mM, für das saure Fragment leicht nach rechts verschoben bei 46 mM.

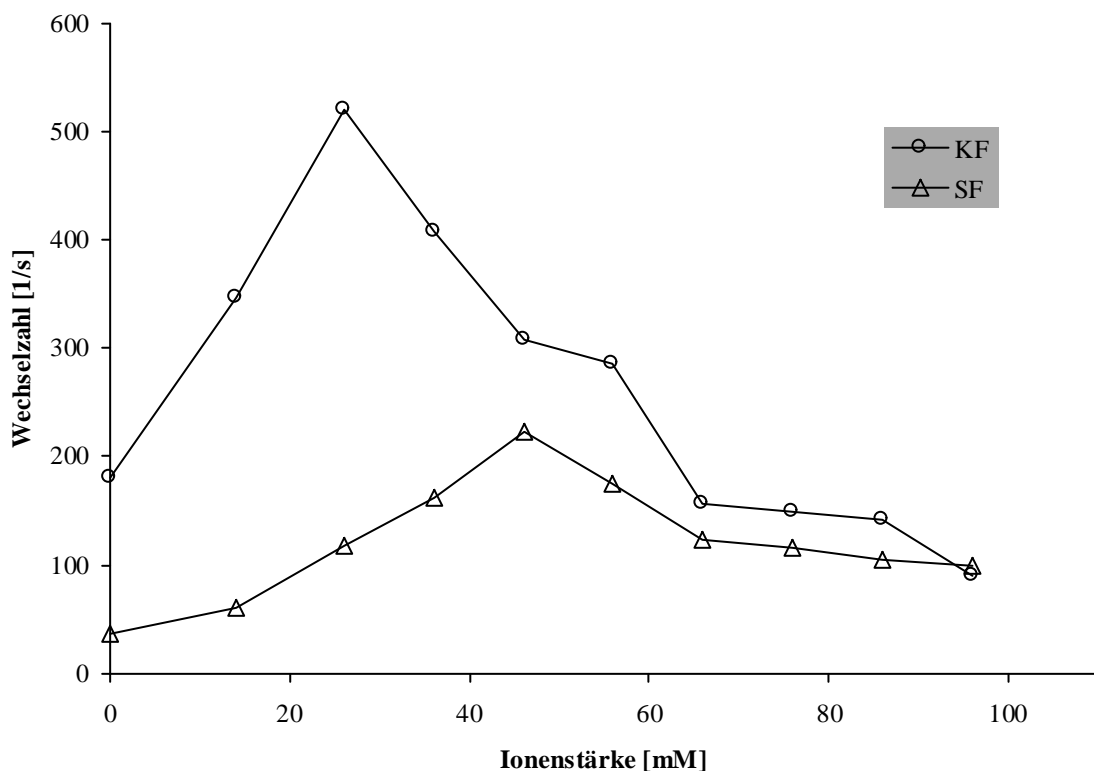


Abbildung 4.10: Ionenstärkeabhängigkeit der Wechselzahl des Elektronentransportes zwischen löslichen Fragmenten des Cytochrom c_1 und Cytochrom c_{552} im *steady-state*-Bereich in Anwesenheit von Cytochrom- c -Oxidase (gekoppelter Test).

Mit dem vorliegenden Messsystem konnte jedoch ebenfalls eine unspezifische Wechselwirkung zwischen COX und Cytochrom c_1 beobachtet werden, die völlig unabhängig von der Anwesenheit von Cytochrom c_{552} auftrat, und um die jede Messung nachträglich korrigiert werden musste. Zudem stellte sich heraus, dass die beobachtete Reaktion nicht unabhängig von der Konzentration an eingesetzter COX war (siehe Kapitel 5.2.1). Aus diesem Grund wurde der Versuchsansatz an dieser Stelle verworfen. Sämtliche Messungen zur Charakterisierung der kinetischen Parameter der Reaktion sowie die Versuche zur Darstellung der Ionenstärkeabhängigkeit ließen sich somit nicht im *steady-state*-Bereich bestimmen.

4.2.2 Untersuchungen im *pre-steady-state*-Bereich

Aufgrund der Ergebnisse, die bei dem Versuch der Etablierung eines Systems zur Messung von *steady-state*-Kinetiken erzielt wurden, konnte darauf geschlossen werden, dass es sich beim Elektronentransport zwischen Cytochrom c_1 und Cytochrom c_{552} um einen sehr schnellen Prozess (Reaktionsgeschwindigkeiten $> 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) handelt. Aus diesem Grund wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Francesco Malatesta an der Universität „La Sapienza“ in Rom ein Messsystem für die Bestimmung des Elektronentransport zwischen Cytochrom c_1 und Cytochrom c_{552} im *pre-steady-state*-Bereich entwickelt und etabliert (siehe 3.3.4). Hierzu wurden zunächst durch Doppelsektor-Küvetten-Versuche (siehe 3.3.3) zwei Wellenlängen im Soret (412 nm und 426.4 nm) ermittelt, bei denen das Problem der spektralen Überlappung der beiden c -Typ Cytochrome umgangen werden konnte.

Wie in 3.3.3 beschrieben, konnten bei diesen Versuchen anhand der Differenz aus zwei Spektren („vor_mix – nach_mix“) die Wellenlängen abgelesen werden, bei denen sich ein Redoxpaar spektroskopisch differenzieren ließ. In einem weiteren Versuchsansatz wurde die Konzentration der jeweiligen eingesetzten Cytochrom c Lösungen variiert, um zu zeigen, dass die ermittelten Wellenlängen der Maxima bzw. Minima konzentrationsunabhängig sind. Die Konzentration des Cytochrom c_1 wurde dabei konstant bei 3 μM gehalten, während Cytochrom c_{552} zwischen 0.1 und 100 μM variiert wurde. Der Vergleich der Differenzspektren zeigte, dass die ermittelten Wellenlängen (412 nm und 424.6 nm) sich auch bei einer 30fachen Erhöhung bzw. 30fachen Erniedrigung der Konzentration des Cytochrom c_{552} gegenüber dem Cytochrom c_1 nicht verschieben (Daten nicht gezeigt). Die

im DSK-Experiment bestimmten Wellenlängen sind daher als konzentrationsunabhängig anzusehen.

In der folgenden Abbildung ist ein solches Differenzspektrum („vor_mix – nach_mix“) exemplarisch gezeigt.

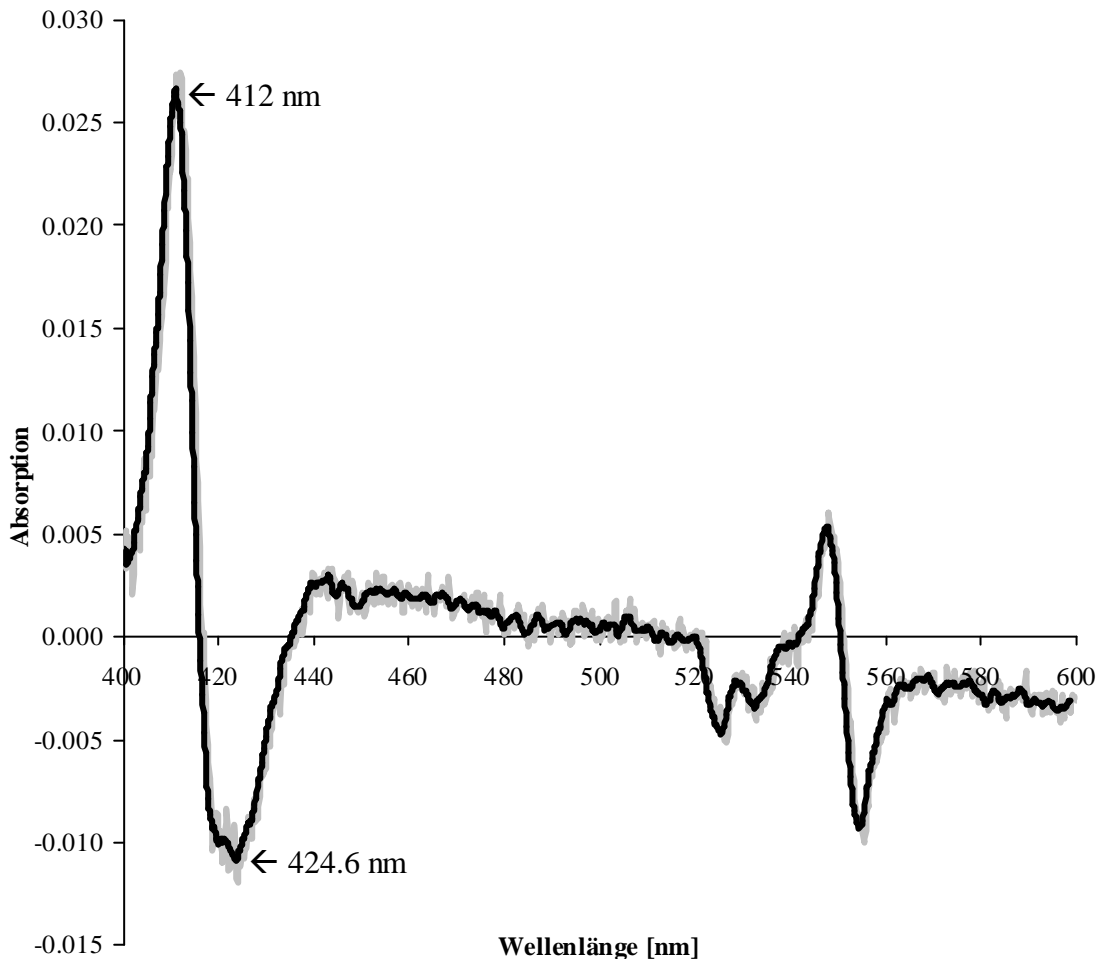


Abbildung 4.11: Differenzspektrum („vor_mix – nach_mix“) der Reaktion zwischen Cytochrom c_1 (KF) und Cytochrom c_{552} . Die beiden für die späteren Messungen relevanten Bereiche (412 und 424.6 nm) sind im Spektrum durch Pfeile gekennzeichnet.

Bei niedrigen Ionenstärken ($I = 36 \text{ mM}$) war zunächst kein Elektronentransport detektierbar (Daten nicht gezeigt). Es wurde vermutet, dass Cytochrom c_1 (KF) unter den Versuchsbedingungen autooxidiert wird. Daraufhin wurde unter sauerstoffarmen Bedingungen gearbeitet. Hierbei konnten unvollständige sehr schnelle Kinetiken detektiert werden (Reaktion zu 80 % bereits in der Totzeit des Gerätes abgeschlossen; Daten nicht gezeigt). In einer anschließenden Versuchsreihe wurde die Ionenstärke erhöht, um die

Reaktion zu verlangsamen. Bei einer Ionenstärke von $I = 136 \text{ mM}$ war es schließlich möglich, vollständige Kinetiken zu messen. Es konnten hierbei für die Reaktion zwischen dem Kernfragment des Cytochrom c_1 und Cytochrom c_{552} sehr schnelle Geschwindigkeitskonstanten ($k_{\text{on}} \approx 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) bestimmt werden (Daten nicht gezeigt).

Es folgten Versuche mit dem Minimalfragment und Pferdeherz Cytochrom c , sowie mit dem sauren Fragment des Cytochrom c_1 (SF) und Cytochrom c_{552} . In allen drei Testsystemen wurden ähnlich schnelle Elektronenaustauschraten gemessen, so dass unter den gegebenen Versuchsbedingungen keine erhöhte Spezifität des *P. denitrificans* Cytochrom c_1 gegenüber seinem homologen Partner bestimmt werden konnte. Alle Kinetiken wurden sowohl mit einer monoexponentiellen als auch mit einer biexponentiellen Funktion angepasst (siehe Diskussion).

In einer weiteren Messreihe konnte die Ionenstärke, bei gleichzeitiger Erniedrigung der Versuchstemperatur auf $3.5 \text{ }^\circ\text{C}$, auf 36 mM abgesenkt werden. Als Nachweis für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurde zunächst eine Versuchsreihe mit Cytochrom c_1 (KF) und Cytochrom c_{552} wiederholt und die Ergebnisse, nach Extrapolation gegen $t = 0$, für k_{on} mit den Daten der Messungen bei erhöhter Temperatur ($19.5 \text{ }^\circ\text{C}$) und höherer Ionenstärke (136 mM) verglichen. Es zeigte sich hierbei kein signifikanter Unterschied (Daten nicht gezeigt), so dass das Messsystem als reproduzierbar angesehen werden konnte.

Zusätzlich zu den Wildtyp-Konstrukten SF und KF wurden verschiedene Mutanten des Kernfragments in ihrer Wechselwirkung zu Cytochrom c_{552} kinetisch untersucht.

Außerdem wurden Versuche mit den Reaktionspaaren Cytochrom c_1 (KF und SF) und Pferdeherz Cytochrom c sowie Cytochrom c_{550} (*P. denitrificans*) und Cytochrom c_{551} (*Pseudomonas aeruginosa*) durchgeführt.

Zur Veranschaulichung einer Datenauswertung sei diese exemplarisch an einem Beispiel (KF Wildtyp mit Cytochrom c_{552}) gezeigt. Im vorliegenden Experiment wurde die Konzentration von Cytochrom c_{552} in einem Bereich zwischen $1 \text{ }\mu\text{M}$ und $10 \text{ }\mu\text{M}$ variiert, während die Konzentration von Cytochrom c_1 (KF) konstant bei $3.53 \text{ }\mu\text{M}$ gehalten wurde. Die Austauschraten ($k_{\text{obs}}^{\text{slow}}$ und $k_{\text{obs}}^{\text{fast}}$) der Reaktion wurden für beide Wellenlängen (412 nm und 424.6 nm) bei insgesamt fünf unterschiedlichen Substratkonzentrationen und einer Ionenstärke von 36 mM bestimmt.

In der folgenden Abbildung ist ein solcher Rohdaten-Verlauf in Form einer simultanen Datenanpassung für die Reaktion zwischen KF ($3.53 \mu\text{M}$) und Cytochrom c_{552} ($3.03 \mu\text{M}$) gezeigt.

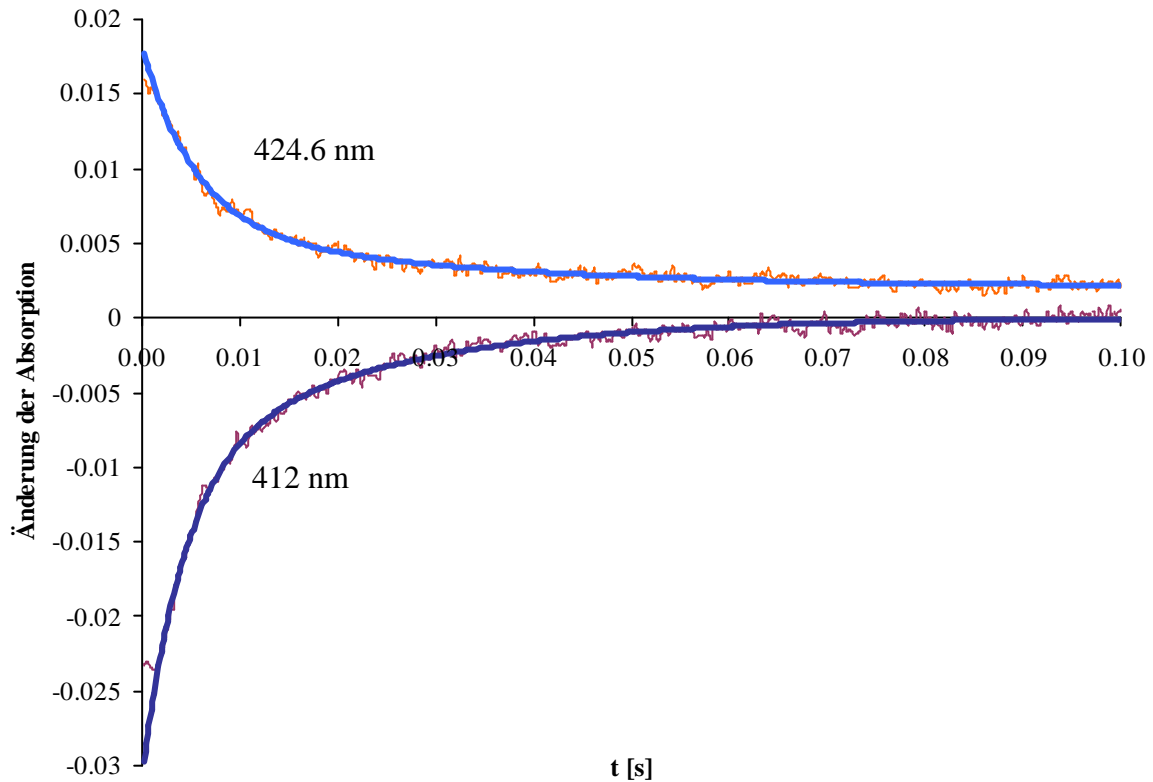


Abbildung 4.12: Simultane Datenanpassung für die Reaktion zwischen KF ($3.53 \mu\text{M}$) und Cytochrom c_{552} ($3.03 \mu\text{M}$) bei 424.6 nm und 412 nm.

Es folgte für jedes Reaktionspaar eine simultane Datenanpassung bei beiden Wellenlängen nach einer Biexponentialfunktion. So erhielt man Werte für $k_{\text{obs}}^{\text{fast}}$ und $k_{\text{obs}}^{\text{slow}}$ bei verschiedenen Substratkonzentrationen. Bei der Anpassung wurden nicht immer alle 400 Datenpunkte mit einbezogen. Die Auswahl der für die Anpassung berücksichtigten Punkte erfolgte hierbei für jeden Datensatz individuell. Gemeinhin wurden hierbei nur die Daten mit einem ausreichendem Signal-Rausch-Verhältnis herangezogen.

Im vorliegenden Fall (Cyt c_1 KF – Cyt c_{552}) ergaben sich hierbei folgende Daten.

Konzentration Cyt c ₅₅₂ [μM]	$k_{\text{obs}}^{\text{fast}}$ [s ⁻¹]	$k_{\text{obs}}^{\text{slow}}$ [s ⁻¹]	Datenpunkte [von - bis]
0.7	286	11	6-400
1.5	154	29	1-400
2.2	311	48	1-400
3.9	479	122	7-100
4.3	272	125	6-200

Tabelle 4.4: Werte für $k_{\text{obs}}^{\text{fast}}$ und $k_{\text{obs}}^{\text{slow}}$ der Reaktion zwischen Cytochrom c_1 KF und Cytochrom c_{552} nach simultaner Datenanpassung bei 412 und 424.6 nm bei verschiedenen Substratkonzentrationen und einer Ionenstärke von 36 mM.

Zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante k_{on} ($k_{\text{on}}^{\text{slow}}$ und $k_{\text{on}}^{\text{fast}}$) wurden die für jede Messung bestimmten Werte von k_{obs} ($k_{\text{obs}}^{\text{slow}}$ und $k_{\text{obs}}^{\text{fast}}$) gegen die jeweilige Konzentration an Cytochrom c_{552} aufgetragen.

Durch eine theoretische Simulation (siehe Diskussion, insbesondere hierzu 5.2.2) konnte im Vorfeld gezeigt werden, dass sich die Geschwindigkeit einer bimolekularen Reaktion, bei der beide Reaktionspartner in äquimolarer Konzentration vorliegen, am besten durch $k_{\text{obs}}^{\text{slow}}$ abbilden lässt. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante k_{on} ausschließlich die Werte für $k_{\text{obs}}^{\text{slow}}$ herangezogen.

Im konkreten Fall der Reaktion zwischen Cytochrom c_1 (KF) und Cytochrom c_{552} ergab sich aus den Werten für $k_{\text{obs}}^{\text{slow}}$ folgende Grafik:

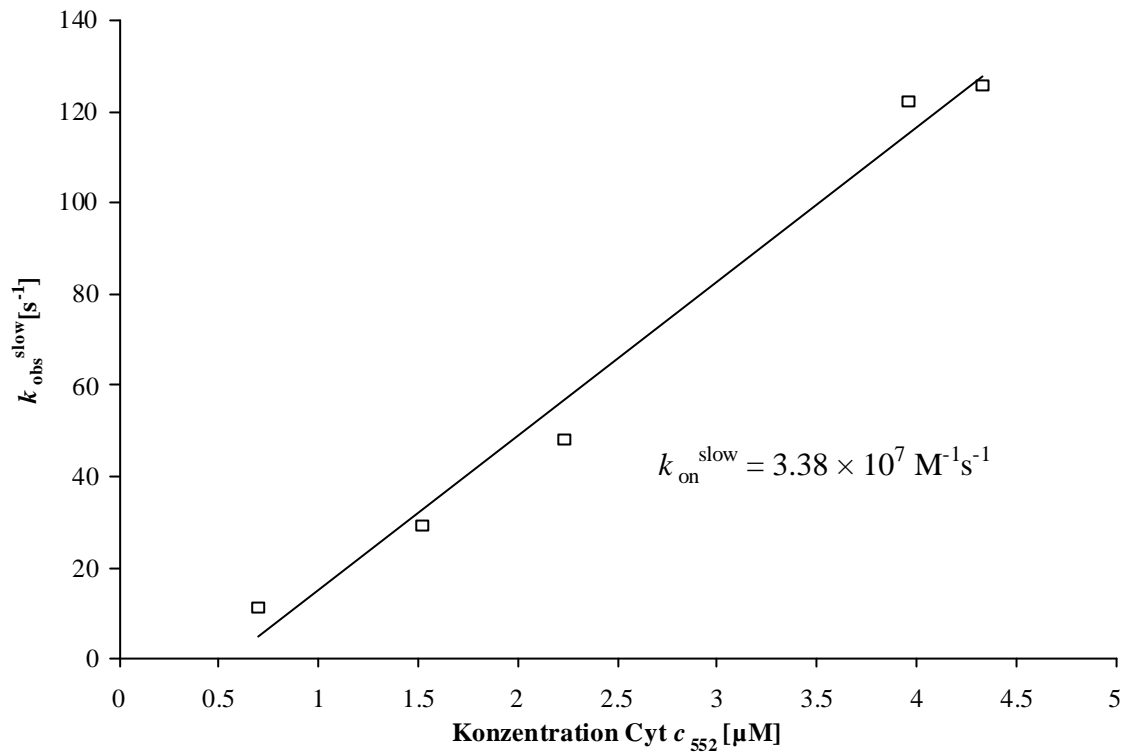


Abbildung 4.13: Auftragung von $k_{\text{obs}}^{\text{slow}}$ gegen die jeweilige Cytochrom c_{552} Konzentration

Es ergab sich somit eine Geschwindigkeitskonstante $k_{\text{on}}^{\text{slow}}$ von $3.38 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für die bimolekulare Reaktion zwischen Cytochrom c_1 (KF) und Cytochrom c_{552} .

In der gleichen Weise wurde das saure Fragment des Cytochrom c_1 in seiner Wechselwirkung mit dem löslichen Fragment des Cytochrom c_{552} aus *P. denitrificans* untersucht.

Es zeigte sich hierbei, dass das saure Fragment unter den gegebenen Versuchsbedingungen vergleichbare Werte für $k_{\text{obs}}^{\text{slow}}$ und $k_{\text{obs}}^{\text{fast}}$ lieferte. Die Ergebnisse hierzu sind analog zu Tabelle 4.4 noch einmal zusammengefasst:

Konz. Cyt c ₅₅₂ [μM]	$k_{\text{obs}}^{\text{fast}}$ [s ⁻¹]	$k_{\text{obs}}^{\text{slow}}$ [s ⁻¹]	Datenpunkte [von - bis]
0.6	331	14	10-400
1.5	250	54	10-400
2.2	501	74	10-400
3.9	619	123	10-400

Tabelle 4.5: Werte für $k_{\text{obs}}^{\text{fast}}$ und $k_{\text{obs}}^{\text{slow}}$ der Reaktion zwischen Cytochrom *c*₁ SF und Cytochrom c₅₅₂ nach simultaner Datenanpassung bei 412 und 424.6 nm bei verschiedenen Substratkonzentrationen und einer Ionenstärke von 36 mM.

Hieraus ergab sich nach linearer Regression eine Geschwindigkeitskonstante $k_{\text{on}}^{\text{slow}}$ von $3.24 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für die bimolekulare Reaktion zwischen Cytochrom *c*₁ (SF) und Cytochrom c₅₅₂. Das saure Fragment des Cytochrom *c*₁ aus *P. denitrificans* zeigte somit im Vergleich zu KF keine erhöhte Spezifität gegenüber dem löslichen Fragment des Cytochrom c₅₅₂ aus *P. denitrificans*.

Zur weiteren Charakterisierung des Elektronentransportes wurden zudem kinetische Untersuchungen mit den beiden Fragmenten SF und KF in ihrer Wechselwirkung mit Pferdeherz Cytochrom *c* durchgeführt. Auch hier zeigten beide Cytochrom *c*₁ Fragmente ein miteinander vergleichbares Elektronentransportverhalten, wobei die ermittelten Werte für die Geschwindigkeitskonstante $k_{\text{on}}^{\text{slow}}$ etwa um den Faktor 2.5 über den Werten für das Reaktionspaar Cyt *c*₁ – Cyt c₅₅₂ lagen.

Sämtliche Ergebnisse hierzu sind zur besseren Übersicht noch einmal in folgender Tabelle zusammengefasst:

Reaktionspaar	$k_{\text{on}}^{\text{slow}}$ [M ⁻¹ s ⁻¹]
Cyt <i>c</i> ₁ KF – Cyt c ₅₅₂	$3.38 \cdot 10^7$
Cyt <i>c</i> ₁ SF – Cyt c ₅₅₂	$3.24 \cdot 10^7$
Cyt <i>c</i> ₁ KF – hh Cyt <i>c</i>	$9.1 \cdot 10^7$
Cyt <i>c</i> ₁ SF – hh Cyt <i>c</i>	$9.3 \cdot 10^7$

Tabelle 4.6: Werte für die Geschwindigkeitskonstante $k_{\text{on}}^{\text{slow}}$ des Elektronentransportes zwischen Cytochrom *c*₁ (KF und SF) und Cytochrom c₅₅₂ (*P. denitrificans*) bzw. Pferdeherz Cytochrom *c* (hh Cyt *c*).

Zusätzlich wurden die beiden löslichen Fragmente des Cytochrom c_1 (KF und SF) in ihrer Wechselwirkung mit dem löslichen Cytochrom c_{550} aus *P. denitrificans* untersucht. Es ergaben sich hier monophasische Kinetiken, und folgende bimolekulare Geschwindigkeitskonstanten:

Reaktionspaar	k_{on}
c_1 KF – c_{550}	$1.3 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$
c_1 SF – c_{550}	$9.7 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$

Tabelle 4.7: Werte für die Geschwindigkeitskonstante k_{on} des Elektronentransportes zwischen Cytochrom c_1 (KF und SF) und Cytochrom c_{550} aus *P. denitrificans*. Die Anpassung der Rohdaten erfolgte hierbei nach einer monoexponentiellen Funktion.

Die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion von Cytochrom c_1 mit Cytochrom c_{550} lagen ebenfalls über denen der Wechselwirkung c_1 – c_{552} und sind somit vergleichbar mit den Werten des Elektronentransportes zwischen Cytochrom c_1 und Pferdeherz Cytochrom c . Zudem zeigt das Kernfragment im Falle der Reaktion mit Cytochrom c_{550} eine im Vergleich zu SF um den Faktor 1.3 erhöhte Geschwindigkeitskonstante.

Die beiden c -Typ Cytochrome KF und SF zeigten mit den drei untersuchten Cytochromen (Pferdeherz Cytochrom c , sowie Cytochrom c_{552} und Cytochrom c_{550} aus *P. denitrificans*) sehr schnelle Elektronentransportraten ($k_{on} \approx 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ bis $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Bei allen hier untersuchten Substraten handelt es sich um lösliche Proteine, die eine basische Interaktionsfläche besitzen, so dass hier aufgrund der entgegengesetzten Oberflächenladungen mit einer Wechselwirkung zu rechnen war.

Die Untersuchungen zur Etablierung einer Negativkontrolle für das System standen jedoch noch aus. Aus diesem Grund wurden die beiden Fragmente KF und SF in ihrer Wechselwirkung mit Cytochrom c_{551} aus *Pseudomonas aeruginosa* hin untersucht. Bei diesem löslichen Cytochrom handelt es sich um ein kleines (9.7 kDa) globuläres Protein mit einer überwiegend stark negativen Oberflächenladung (Cutruzzola *et al.*, 1997).

Die Versuche wurden ebenfalls bei einer Ionenstärke von 36 mM und einer Versuchstemperatur von 4.7 °C durchgeführt. Zuvor wurde anhand der beschriebenen

Doppelsektor-Küvetten-Experimente (siehe 3.3.3) eine Wellenlänge von 414 nm als optimale Detektionswellenlänge für Untersuchungen zwischen Cytochrom c_1 und Cytochrom c_{551} bestimmt.

In der folgenden Abbildung ist ein Rohdaten-Verlauf für die Reaktion zwischen *P. denitrificans* Cytochrom c_1 KF und *Ps. aeruginosa* Cytochrom c_{551} gezeigt.

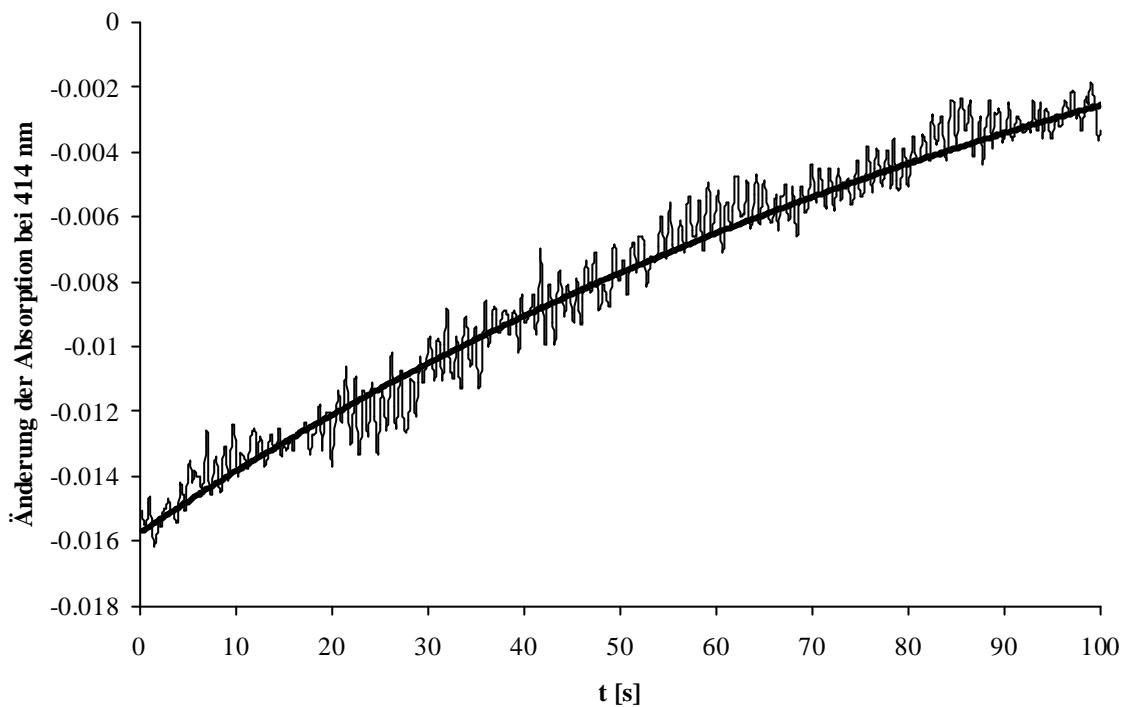


Abbildung 4.14: Verlauf der Reaktion zwischen Cytochrom c_1 KF (2.86 μM) und Cytochrom c_{551} (3.49 μM) bei 414 nm.

Man erkennt hier recht deutlich, dass die Reaktion wesentlich langsamer verläuft als bei der Wechselwirkung zwischen Cytochrom c_1 und Cytochrom c_{552} (siehe hierzu Abbildung 4.12). Für den Elektronentransport zwischen diesen beiden c -Typ Cytochromen konnte in diesem konkreten Fall eine Geschwindigkeit (k_{obs}) von 0.0074 s^{-1} bestimmt werden. Zudem war die Reaktion nach 100 s immer noch nicht vollständig abgeschlossen. Der Verlauf der Rohdaten dieser Reaktion ließ sich ausschließlich mit einer monoexponentiellen Funktion anpassen.

Analog zu den Untersuchungen mit Cytochrom c_{552} wurde auch hier die Konzentration des Cytochroms aus *Pseudomonas* im Bereich von 1.5 μM bis 5 μM variiert und Werte für k_{obs}

bestimmt. Anschließend wurde diese in Abhängigkeit von der jeweiligen Cytochrom c_{551} Konzentration aufgetragen. Es ergab sich hierbei folgende Grafik.

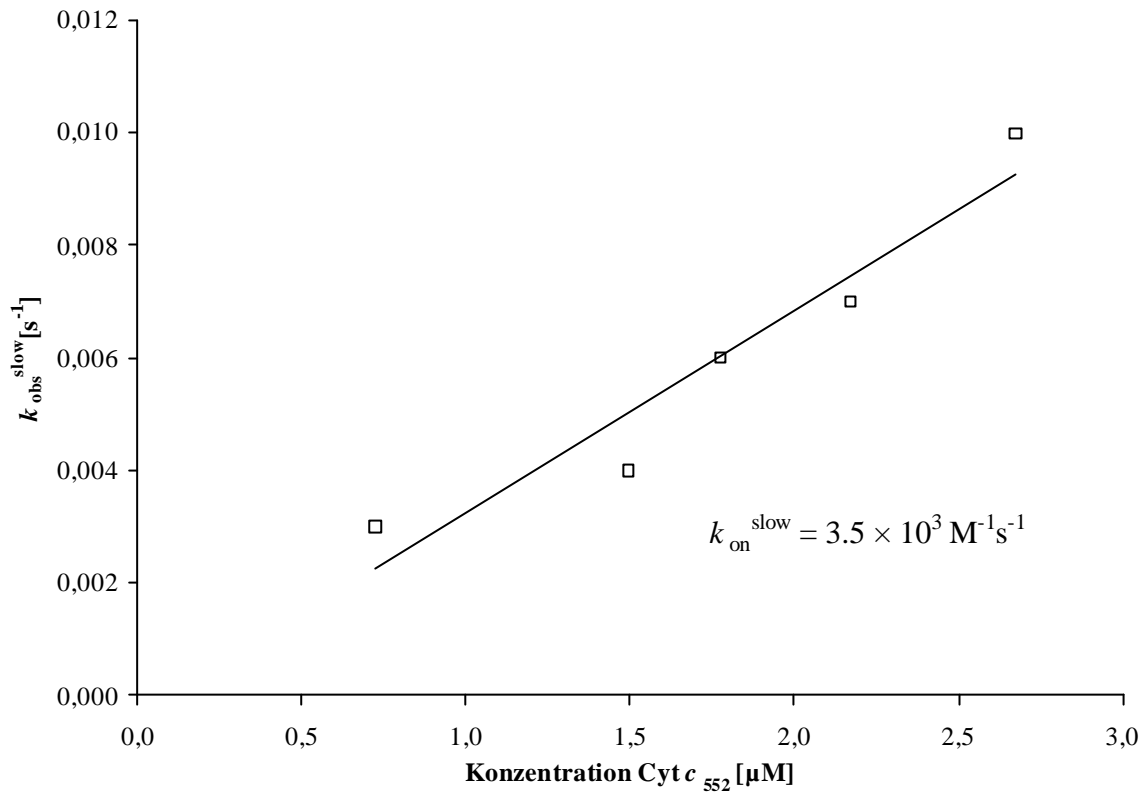


Abbildung 4.15: Auftragung von $k_{\text{obs}}^{\text{slow}}$ der Reaktion von *P. denitrificans* Cytochrom c_1 (KF) gegen die jeweilige Cytochrom c_{551} Konzentration.

Die Versuche wurden sowohl mit KF, als auch mit SF durchgeführt. Durch die Auftragung der ermittelten Werte für k_{obs} gegen die jeweilige Konzentration an Cytochrom c_{551} erhielt man analog zu den vorangegangenen Versuchen die Werte für die Geschwindigkeitskonstante k_{on} der Reaktion zwischen *P. denitrificans* Cytochrom c_1 und *Ps. aeruginosa* Cytochrom c_{551} . Die Werte sind in folgender Tabelle zusammengefasst.

Reaktionspaar	k_{on}
c_1 KF – c_{551}	$3.5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
c_1 SF – c_{551}	$1.9 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$

Tabelle 4.8: Werte für die Geschwindigkeitskonstante k_{on} des Elektronentransportes zwischen Cytochrom c_1 (KF und SF) und Cytochrom c_{551} aus *Ps. aeruginosa*.

Hierbei fällt auf, dass man für das saure Fragment eine im Vergleich zu der Reaktion mit KF um den Faktor 5 höhere Geschwindigkeitskonstante erhält. Vergleicht man die erhaltenen Werte mit den Geschwindigkeitskonstanten der Reaktionen von SF und KF mit Cytochrom c_{552} , so ergibt sich für KF ein um den Faktor 10.000 erniedrigter Wert für k_{on} , für das saure Fragment hingegen eine um den Faktor 2.000 erniedrigte Geschwindigkeitskonstante.

Zur besseren Übersicht sind sämtliche für die beiden Fragmente KF und SF bestimmten bimolekularen Geschwindigkeitskonstanten hier noch einmal zusammengefasst.

Reaktionspaar	k_{on}
c_1 KF – c_{552} (<i>P. d.</i>)	$3.38 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
c_1 SF – c_{552} (<i>P. d.</i>)	$3.24 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
c_1 KF – c_{551} (<i>Ps. a.</i>)	$3.5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
c_1 SF – c_{551} (<i>Ps. a.</i>)	$1.9 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
c_1 KF – c_{550} (<i>P. d.</i>)	$13 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
c_1 SF – c_{550} (<i>P. d.</i>)	$9.7 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
c_1 KF – c (hh)	$9.1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
c_1 SF – c (hh)	$9.3 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$

Tabelle 4.9: Übersicht über die Werte der bimolekularen Geschwindigkeitskonstante k_{on} des Elektronentransportes zwischen *P. denitrificans* Cytochrom c_1 (KF und SF) und anderen c -Typ Cytochromen bei $I = 36 \text{ mM}$. *P. d.* = *P. denitrificans*; *Ps. a.* = *Ps. aeruginosa*; hh = Pferdeherz.

Zusammenfassend konnte somit keine erhöhte Spezifität des sauren Fragments von Cytochrom c_1 gegenüber dem Minimalfragment (KF) für das Substrat Cytochrom c_{552} sowie für alle anderen untersuchten c -Typ Cytochrome ermittelt werden.

4.2.3 Ionenstärkeabhängigkeit

Die Geschwindigkeitskonstante k einer bimolekularen Reaktion wird beschrieben durch:

$$v = \left(\frac{\partial A}{\partial t} \right) = -k \cdot [A] \cdot [B] \quad (\text{Gleichung 4.1})$$

In einem vereinfachten Modell ist k konstant, was bedeutet, dass sich bei einer Verdopplung der Konzentration von A (und konstantem B) die Geschwindigkeit v ebenfalls verdoppelt. Diese Annahme ist nicht richtig, wenn die Reaktanden nicht nur untereinander, sondern auch mit den im Lösungsmittel gelösten Molekülen reagieren. Besonders wichtig wird dies, wenn die reagierenden Moleküle eine Ladung tragen. So fanden Brønsted und La Mer (Brønsted und La Mer, 1924) für Reaktionen von geladenen Teilchen in Lösung heraus, dass bei hohen Konzentrationen die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k nicht mehr konstant ist, sondern mit ansteigender Ionenstärke (ansteigender Konzentration der geladenen Teilchen in der Lösung) kontinuierlich abnimmt. Dieses Phänomen wird als „primärer Salzeffekt“ beschrieben.

Das Brønsted-Gesetz für die Änderung der Reaktionsgeschwindigkeit einer Reaktion zweier geladener Teilchen A und B wird beschrieben durch die Gleichung:

$$k = {}^{\infty}k_0 \cdot 10^{2 \cdot A \cdot z_A \cdot z_B \cdot \sqrt{I}} \quad (\text{Gleichung 4.2})$$

oder

$$\log k = \log {}^{\infty}k_0 + 2 \cdot A \cdot z_A \cdot z_B \cdot \sqrt{I} \quad (\text{Gleichung 4.3})$$

Für Reaktionen in Wasser ist die Konstante A gleich 0.509, z_A und z_B sind die effektiven Ladungen der beiden geladenen Reaktionspartner und I ist die Ionenstärke.

Das von Brønsted und La Mer beschriebene Phänomen des „primären Salzeffektes“ geht auf die Debye-Hückelsche Theorie der Thermodynamik gelöster Ionen zurück. Die Anwesenheit anderer Ionen im Lösungsmittel stabilisiert hierbei die Akkumulierung der Ladung, bzw. erniedrigt die Freie Enthalpie. Haben A und B das gleiche Ladungsvorzeichen, so hat der aktivierte Komplex AB^* eine höhere Ladung als jeder der einzelnen Reaktanden. In einem solchen Fall wird die Reaktion zwischen A und B durch die Erhöhung der Ionenstärke im Lösungsmittel beschleunigt. Nach der Theorie von Debye und Hückel ist jedes positiv geladene Teilchen bestrebt, eine Ionenatmosphäre aus negativ

geladenen Teilchen um sich herum zu generieren und umgekehrt. Zusammenfassend bedeutet diese Tendenz von geladenen Teilchen, eine hohe Aufenthaltswahrscheinlichkeit in der Nähe von sog. Gegenionen zu haben, so dass die freie Reaktionsenthalpie jedes Ions weniger stark ansteigt, als man es bei einer logarithmischen Abhängigkeit von nicht-interagierenden gelösten Reaktanden erwarten würde.

Nachdem eine Messung der spezifischen Ionenstärkeabhängigkeit der Reaktion zwischen Cytochrom c_1 und Cytochrom c_{552} mittels des gekoppelten Tests nicht möglich war, wurde diese mit Hilfe einer Stopped-Flow-Apparatur im *pre-steady-state*-Bereich bestimmt. Hierzu wurden äquimolare Mengen ($\sim 5 \mu\text{M}$) an reduziertem Cytochrom c_1 und oxidiertem Cytochrom c_{552} eingesetzt. Das Cytochrom c_1 wurde in einem Puffer niedriger Ionenstärke ($I = 16 \text{ mM}$) vorgelegt und die Ionenstärke der Cytochrom c_{552} -Lösung für jeden Messpunkt dahingehend verändert, dass Datenpunkte im Bereich von $16 - 166 \text{ mM}$ („nach_mix“) aufgenommen werden konnten. Für jeden Messpunkt wurde ein Mittelwert aus vier Messungen gebildet. Die Messung erfolgte bei 4.7°C und einer Wellenlänge von 412 nm (siehe hierzu Abbildung 4.11). Bei niedrigen Ionenstärken ($< 36 \text{ mM}$) war der Elektronentransport so schnell, dass ein Großteil der Reaktion bereits innerhalb der Totzeit der Apparatur abgelaufen war. Die Daten konnten in diesem Fall nur durch die anschließende mathematische Auswertung der Rohdaten bestimmt werden. Für Ionenstärken unter 16 mM konnten keine reproduzierbaren Daten gewonnen werden. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mit dem Programm *matlab 4.0*. Die Datensätze konnten mit einer monoexponentiellen Funktion ausgewertet werden, wobei hierbei für die Bestimmung der Geschwindigkeit k_{obs} nicht immer alle Datenpunkte (1-400) der jeweiligen Messung mit einbezogen wurden.

Die erhaltenen Werte der einzelnen Reaktionspaare sowie der für die Rechnung berücksichtigte Datenbereich sind in folgender Tabelle zusammengefasst.

Ionenstärke [mM]	k_{obs} (KF) [s ⁻¹]	Datenpunkte [von bis]	k_{obs} (SF) [s ⁻¹]	Datenpunkte [von bis]
16	508	5-60	407	5-200
26	476	7-100	398	6-150
36	436	7-100	297	6-200
46	281	7-400	231	6-400
55	272	8-400	200	7-400
64	199	8-400	161	7-400
72	160	8-400	145	7-400
80	142	8-400	122	7-400
88	125	8-400	108	7-400
95	106	8-400	96	7-400
105	86	8-400	82	7-400
122	67	8-400	64	7-400
144	47	8-400	53	7-400
166	35	8-400	39	7-400

Tabelle 4.11: Geschwindigkeiten des Elektronentransportes zwischen löslichen Fragmenten von Cytochrom c_1 (KF/SF) und Cytochrom c_{552} in Abhängigkeit der Ionenstärke. Die Daten wurden hierbei nach einer monoexponentiellen Funktion angepasst.

Die angepassten Werte für k_{obs} wurden daraufhin gegen die Ionenstärke aufgetragen. Hierfür ergab sich folgende Grafik:

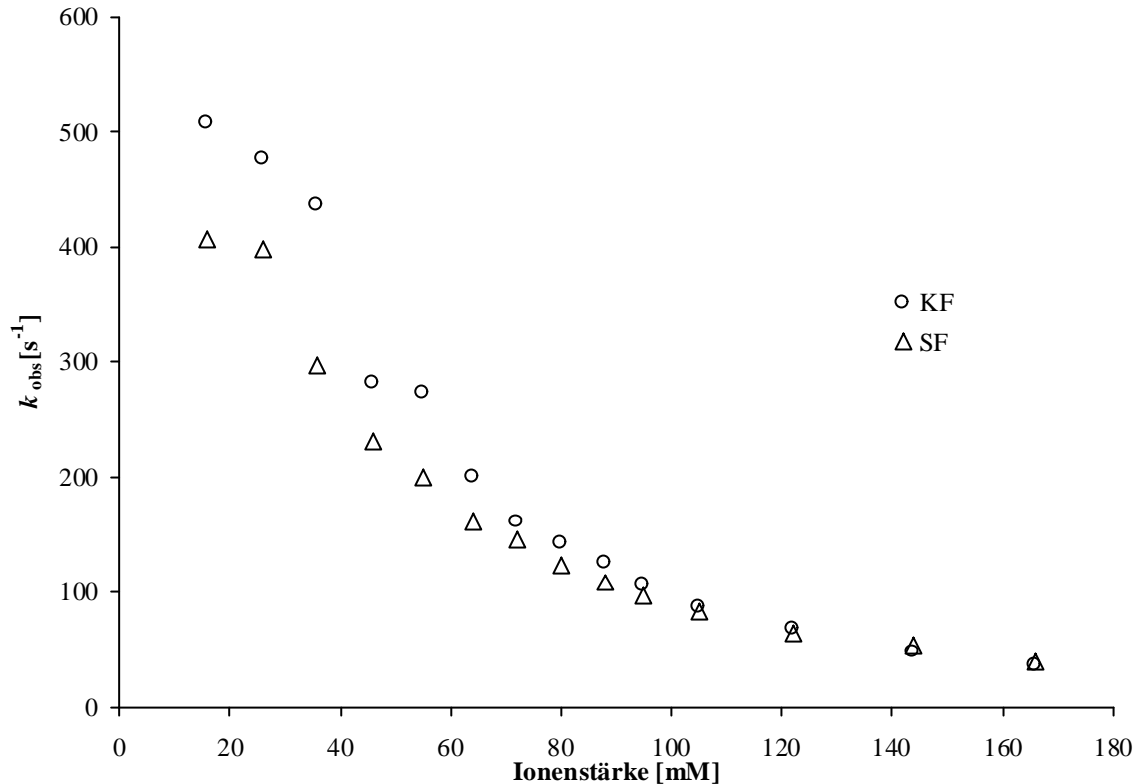


Abbildung 4.16: Ionenstärkeabhängigkeit der Geschwindigkeit des Elektronentransportes zwischen löslichen Fragmenten von Cytochrom c_1 (KF und SF) und Cytochrom c_{552} im pre-steady-state-Bereich. Die Daten wurden nach einer monoexponentiellen Funktion angepasst.

Es zeigte sich hierbei, dass die beiden Fragmente KF und SF in ihrer Reaktion mit *P. denitrificans* Cytochrom c_{552} eine sehr ähnliche Ionenstärkeabhängigkeit aufweisen. Eine Rechtsverschiebung der Kurve für das saure Fragment konnte nicht beobachtet werden. Unter den gegebenen Messbedingungen (3.5 °C, pH 8.0) konnte somit keine erhöhte Substratspezifität des sauren Fragments gegenüber der des Minimalfragments für lösliches Cytochrom c_{552} festgestellt werden.

Es wurde ebenfalls eine Anpassung der Rohdaten mit einer biexponentiellen Funktion durchgeführt. Die dabei erhaltenen Werte sind analog in folgender Tabelle zusammengefasst:

Ionenstärke [mM]	KF $k_{\text{obs}}^{\text{fast}}$ [s ⁻¹]	KF $k_{\text{obs}}^{\text{slow}}$ [s ⁻¹]	Datenpunkte [von bis]	SF $k_{\text{obs}}^{\text{fast}}$ [s ⁻¹]	SF $k_{\text{obs}}^{\text{slow}}$ [s ⁻¹]	Datenpunkte [von bis]
16	n.b.	n.b.	-	559	155	5-200
26	546	15	7-100	521	144	6-150
36	490	138	7-100	467	129	6-200
46	444	126	7-400	433	92	6-400
55	636	223	8-400	437	128	7-400
64	480	137	8-400	394	101	7-400
72	430	113	8-400	364	96	7-400
80	343	100	8-400	302	83	7-400
88	377	97	8-400	237	67	7-400
95	462	90	8-400	181	57	7-400
105	186	59	8-400	285	64	7-400
122	195	53	8-400	167	45	7-400
144	124	36	8-400	155	41	7-400

Tabelle 4.12: Geschwindigkeiten des Elektronentransportes zwischen löslichen Fragmenten von Cytochrom c_1 (KF und SF) und Cytochrom c_{552} in Abhängigkeit der Ionenstärke. Die Daten wurden hierbei nach einer biexponentiellen Funktion angepasst.

Bei einer Ionenstärke von 16 mM konnten die Daten der Reaktion zwischen Kernfragment und Cytochrom c_{552} nicht nach einer Biexponentialfunktion angepasst werden.

Auch in diesem Fall wurden die angepassten Werte für k_{obs} gegen die jeweilige Ionenstärke aufgetragen.

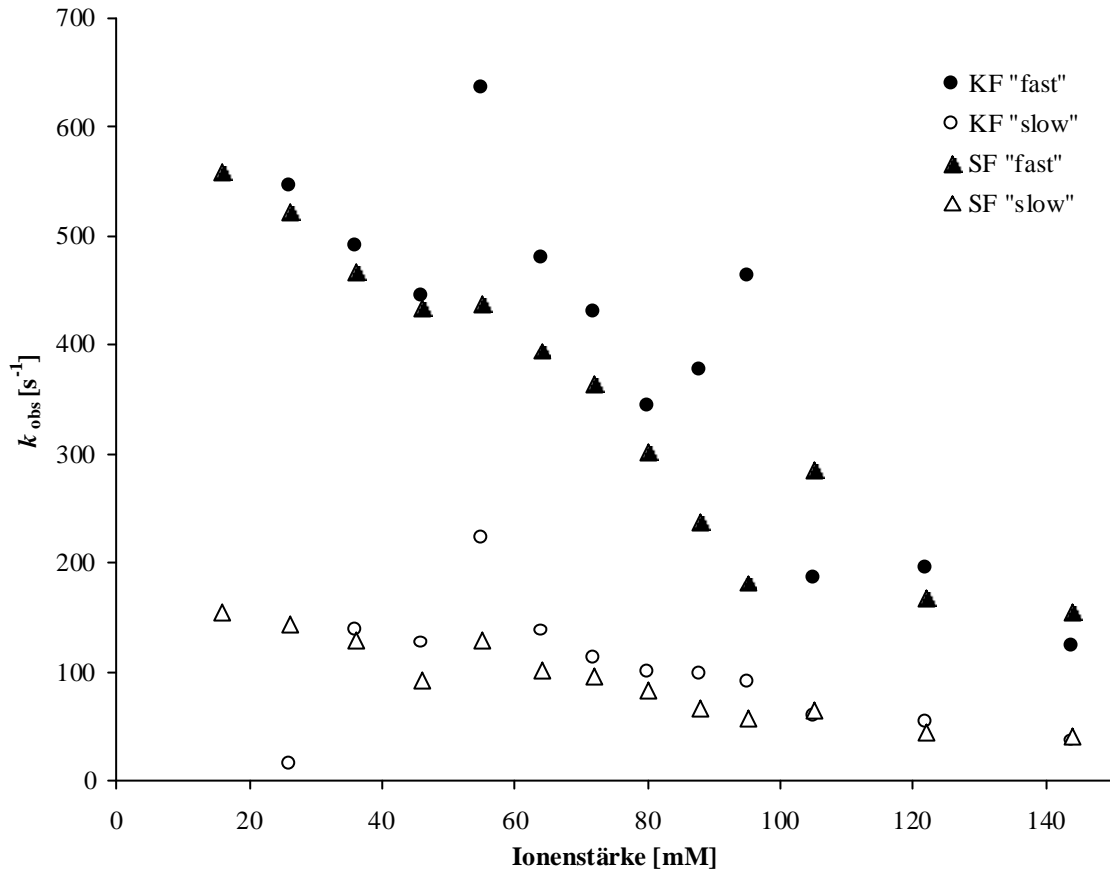


Abbildung 4.17: Ionenstärkeabhängigkeit der Geschwindigkeit des Elektronentransportes zwischen löslichen Fragmenten von Cytochrom c_1 und Cytochrom c_{552} im *pre-steady-state*-Bereich. Die Daten wurden nach einer biexponentiellen Funktion angepasst.

Es zeigte sich hierbei, dass sich die Messungen zur Ionenstärkeabhängigkeit zwischen saurem Fragment (SF) und Cytochrom c_{552} sehr gut mit einer monoexponentiellen Funktion anpassen ließen, während die Streuung der Datenpunkte – und dies galt insbesondere für die schnelle Phase – der Messung zwischen Kernfragment und Cytochrom c_{552} nach einer Biexponentialoperation sehr groß war und somit zu einem weniger befriedigenden Ergebnis führte. Schon anhand der Rohdaten war erkennbar, dass die Wechselwirkung zwischen Kernfragment und dem löslichen Elektronenakzeptor Cytochrom c_{552} speziell im Bereich niedriger Ionenstärken unter den gegebenen Messbedingungen zu wesentlich höher gestreuten Ergebnissen führte. Aus diesem Grund wurden hierbei für jeden Messpunkt bis zu sechs Messkurven aufgenommen und anschließend über mindestens vier Datensätze gemittelt. Zusätzlich wurde bei der

Auswertung der Rohdaten durch das Programm *matlab 4.0* die Anzahl der für die Rechnung relevanten Datenpunkte individuell variiert.

Nach erfolgter Anpassung aller Datensätze nach Mono- und Biexponentialfunktionen wurden die erhaltenen Werte für k_{obs} semilogarithmisch gegen die Ionenstärke aufgetragen. Aus der Steigung der daraus resultierenden Kurve erhielt man nach der Brönsted-Gleichung (Gleichung 4.3) die Werte für das Produkt aus A z_A und z_B . Die effektiven Ladungen z_A und z_B auf den jeweiligen Oberflächen zweier miteinander wechselwirkenden Proteine beschreiben letztendlich die Anzahl derjenigen Reste, die für die Interaktion der Proteine verantwortlich sind. Die Bestimmung der apparenten Geschwindigkeitskonstante k_{on}^0 der Reaktion erfolgte durch Extrapolation der gemessenen Werte für k_{obs} gegen $I = 0$. Sowohl die Messungen zur Ionenstärkeabhängigkeit der Reaktion des sauren Fragments des Cytochrom c_1 (SF) und Cytochrom c_{552} , als auch die Messungen mit dem Kernfragment ließen sich mit einer monoexponentiellen Funktion zu einem befriedigenden Ergebnis anpassen.

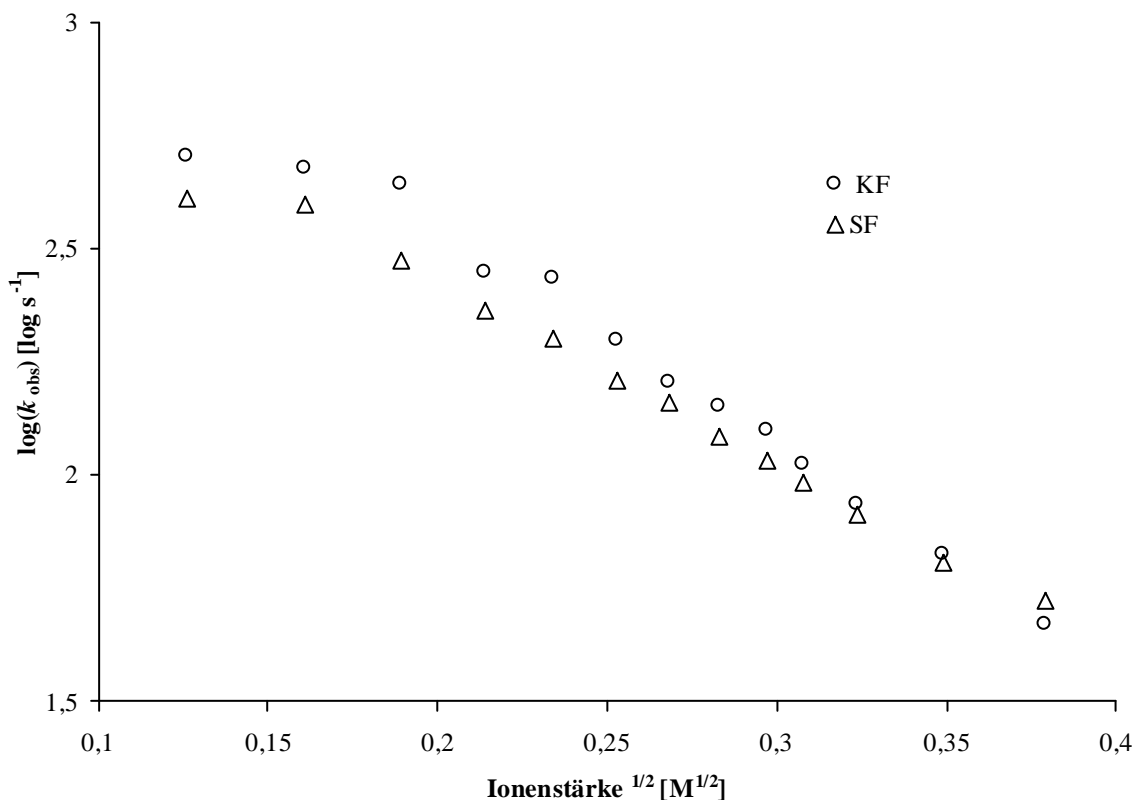


Abbildung 4.18: Semilogarithmische Auftragung von $\log k_{\text{obs}}$ (KF/SF) gegen die Ionenstärke (Brönsted-Plot). Die Anpassung der Daten erfolgte nach einer Monoexponentialfunktion.

Unter der Anwendung von Gleichung 4.3 ergaben sich hieraus folgende Werte:

	KF	SF
k_{obs}^0	3198	1508
$\log(k_{\text{obs}}^0)$	3.5	3.2
$A z_A z_B$	- 4.8	- 3.9
r	0.99	0.99

Tabelle 4.13: Ergebnisse aus den nach der Brønsted-Gleichung aufgetragenen Datensätze (Brønsted Plot). Die Anpassung erfolgte hierbei nach einer monoexponentiellen Funktion. r = Korrelationskoeffizient.

Die Steigung ist für beide Reaktionspärchen negativ. Setzt man bei den gegebenen Reaktionsbedingungen von $\sim 5^\circ\text{C}$ den Faktor $2A = 1$ (siehe dazu Brønsted und La Mer, 1924), so ergibt sich für das Produkt aus z_A und z_B demnach auch ein negativer Wert. Die beiden untersuchten Cytochrome besitzen auf ihrer Oberfläche Nettoladungen unterschiedlichen Vorzeichens. Für die Wechselwirkung zwischen KF und Cytochrom c_{552} ist das Produkt der beiden effektiven Ladungen vom Betrag her näherungsweise 5. Demnach ist das Produkt der an der Wechselwirkung zwischen Cytochrom c_1 und Cytochrom c_{552} beteiligten Oberflächenladungen vom Betrag her 5. Wenn man davon ausgeht, dass nur positiv geladene Reste des Cytochrom c_{552} und nur negativ geladene Reste des Cytochrom c_1 an der Wechselwirkung der beiden Proteine beteiligt sind, würde dies – rein rechnerisch – bedeuten, dass 2-3 positive Ladungen des Cytochrom c_{552} in direkter Wechselwirkung zu 2-3 negativen Ladungen auf der Oberfläche des Cytochrom c_1 (KF) stehen.

Für das Reaktionspaar aus saurem Fragment und Cytochrom c_{552} liegt der Wert für das Produkt aus den effektiven Ladungen z_A und z_B etwas niedriger bei ~ -4 . Somit wären in diesem Fall nur etwa 2 Oberflächenladungen auf jedem der beiden Proteine an der Interaktion beteiligt.

Auch wenn die exakte Anzahl der an der Wechselwirkung beteiligten Ladungen nicht bestimmt werden konnte, so ist dennoch eindeutig, dass der Elektronentransfer zwischen Cytochrom c_1 und Cytochrom c_{552} elektrostatischer Natur ist.

Zusätzlich wurden die Daten der Untersuchungen zur Ionenstärkeabhängigkeit zwischen Cytochrom c_1 (KF und SF) und Cytochrom c_{552} nach der Brønsted-Gleichung mit einer Biexponentialfunktion angepasst. Die Ergebnisse sind hier zusammengefasst.

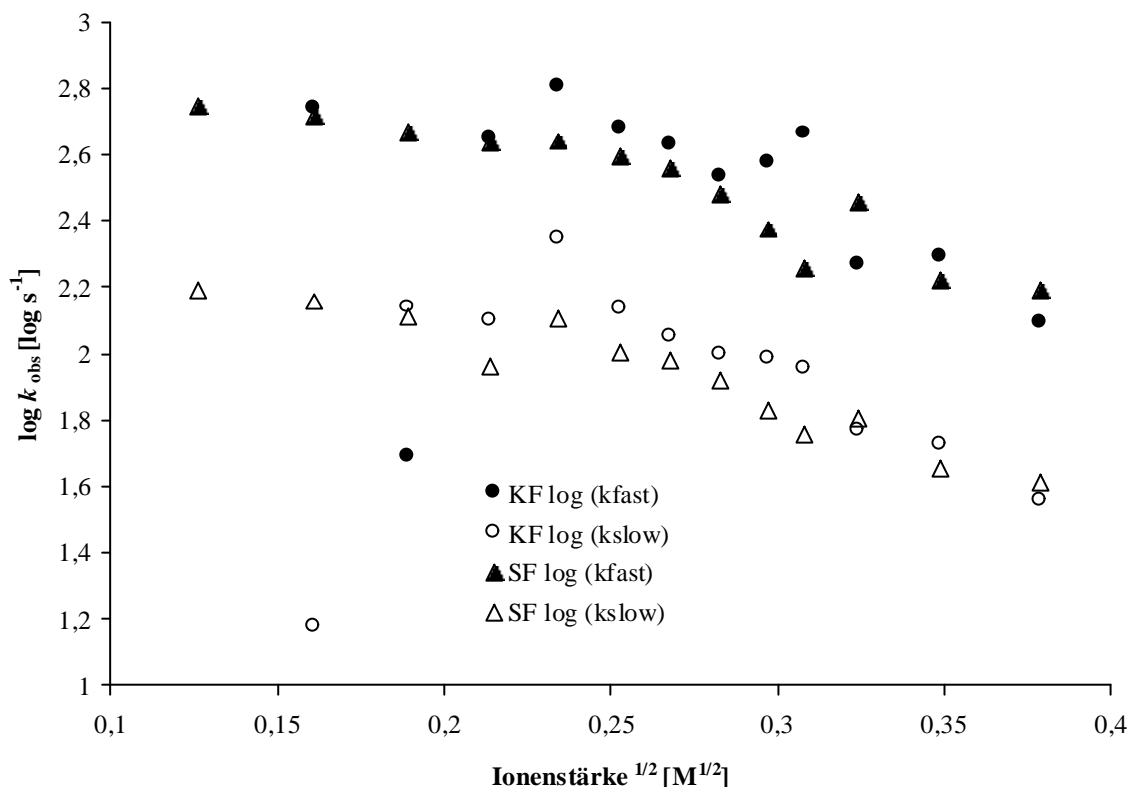


Abbildung 4.19: Semilogarithmische Auftragung von $\log k_{\text{obs}}$ (KF/SF) gegen die Ionenstärke (Brønsted Plot). Die Anpassung erfolgte nach einer Biexponentialfunktion.

Auch hier zeigte sich, dass die Streuung der Daten aus der Messung mit dem saurem Fragment wesentlich geringer war, als bei der Betrachtung der Messwerte für die Interaktion zwischen Cytochrom c_{552} und Minimalfragment. Bei niedrigen Ionenstärken ($I = 16$ mM) konnten die Messkurven auch mit dem Programm *matlab 4.0* nicht nach einer biexponentiellen Funktion angepasst werden. Für die Messungen bei 26 mM und 36 mM war die Streuung der Datensätze noch sehr hoch. Für die Extrapolation der Reaktionsgeschwindigkeit k_{obs} gegen $I = 0$ wurden dennoch alle Datensätze berücksichtigt. Die Ergebnisse hierzu sind in folgender Tabelle zusammengefasst.

	KF_{fast}	KF_{slow}	SF_{fast}	SF_{slow}
k_{obs}^0	8033	2724	1483	392
$\log(k_{\text{obs}}^0)$	3.9	3.4	3.2	2.6
A _{zA} z _B	- 4.6	- 4.9	- 2.5	- 2.5
r	0.92	0.98	0.94	0.96

Tabelle 4.14: Ergebnisse aus den nach der Brønsted-Gleichung aufgetragenen Datensätze (Brønsted Plot). Die Anpassung erfolgte hierbei nach einer biexponentiellen Funktion. r = Korrelationskoeffizient.

Analog der Ergebnisse für die monoexponentielle Auswertung (siehe Tabelle 4.13) liegt das Produkt der an der Wechselwirkung zwischen Kernfragment und Cytochrom c_{552} beteiligten Ladungen ebenfalls bei etwa 5, während für die Interaktion zwischen saurem Fragment des Cytochrom c_1 und dessen Elektronenakzeptor der Wert für das Produkt der effektiven Ladungen bei 2.5 liegt. Zusammenfassend sind somit nach Anpassung der Daten an eine Biexponentialfunktion rein rechnerisch für das Reaktionspärchen Cyt SF c_1 - c_{552} 1-2 effektive Ladungen auf jedem Fragment an der Interaktion beteiligt, während bei Cyt KF c_1 - c_{552} insgesamt 2-3 Ladungen pro Reaktionspartner bestimmt wurden. Vergleicht man die Daten beider Tabellen (4.13 und 4.14) miteinander, wird jedoch deutlich, dass die Anpassung der Rohdaten nach einer monoexponentiellen Funktion zu jeweils höheren Korrelationskoeffizienten führt. Der Verlauf der Rohdaten konnte jedoch wesentlich besser mit einer Biexponentialfunktion abgebildet werden. Aus diesem Grund sind diese Daten, trotz höherer Streuung, wesentlich besser für die Auswertung der gewonnenen Rohdaten geeignet (siehe Diskussion).

Zur Bestimmung der apparenten bimolekularen Geschwindigkeitskonstante k_{on}^0 des Elektronentransportes zwischen Cytochrom c_1 und Cytochrom c_{552} wurden die gegen $I = 0$ extrapolierten Geschwindigkeiten (k_{obs}^0) durch die Anfangskonzentration an Cytochrom c_{552} geteilt. Man erhielt hierbei die folgenden Werte.

Reaktionspaar	$k_{\text{on}}^{\text{fast}}$	$k_{\text{on}}^{\text{slow}}$	$k_{\text{on}}^{\text{mono}}$
$c_1 \text{ KF} - c_{552}$	$2.7 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$9.0 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$1.1 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$
$c_1 \text{ SF} - c_{552}$	$5.7 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$1.5 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$5.7 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$

Tabelle 4.15: Werte für die apparente bimolekulare Geschwindigkeitskonstante k_{on}^0 des Elektronentransportes zwischen Cytochrom c_1 (KF und SF) und Cytochrom c_{552} . Es sind hierbei sowohl die Werte für eine Anpassung nach einer monoexponentiellen als auch nach einer biexponentiellen Funktion gezeigt. Die für die Interpretation der Daten relevante Datenanpassung ist hierbei grau unterlegt.

Die ermittelten Werte divergieren untereinander sehr stark. So zeigt sich, dass das saure Fragment bei einer Anpassung nach einer monoexponentiellen Funktion eine fünffach höhere Geschwindigkeitskonstante als KF hat. Anhand der Daten der schnellen Phase einer biphasischen Interpretation sind diese nur noch zweifach gegenüber KF erhöht. Vergleicht man hingegen die Daten der langsamen Phase miteinander, weist das Kernfragment eine sechsfach erhöhte bimolekulare Austauschrate mit Cytochrom c_{552} auf.

Es konnte jedoch im Vorfeld anhand einer mathematischen Simulation gezeigt werden, dass sich der Verlauf des Elektronentransports zwischen Cytochrom c_1 und Cytochrom c_{552} unter den beschriebenen Bedingungen am besten durch die bestimmten Werte der langsamen Phase ($k_{\text{obs}}^{\text{slow}}$) einer biphasischen Reaktion abbilden lässt (siehe Diskussion). Aus diesem Grund liefern die in der Tabelle grau unterlegten Werte für k_{on} die beste Auswertung der gemessenen Daten.

Austauschraten in dieser Größenordnung lassen zudem eindeutig auf einen diffusionskontrollierten Prozess schließen.

Anhand der Amplituden der Reaktionen kann man durch die Anwendung der Nernst-Gleichung Rückschlüsse auf die Gleichgewichtskonstante K_{EQ} der Elektronentransportreaktion zwischen Cytochrom c_1 und Cytochrom c_{552} schließen.

Trägt man die Amplituden der einzelnen Messpunkte gegen die jeweilige Ionenstärke auf, ergibt sich für die monoexponentiale Anpassung folgende Grafik.

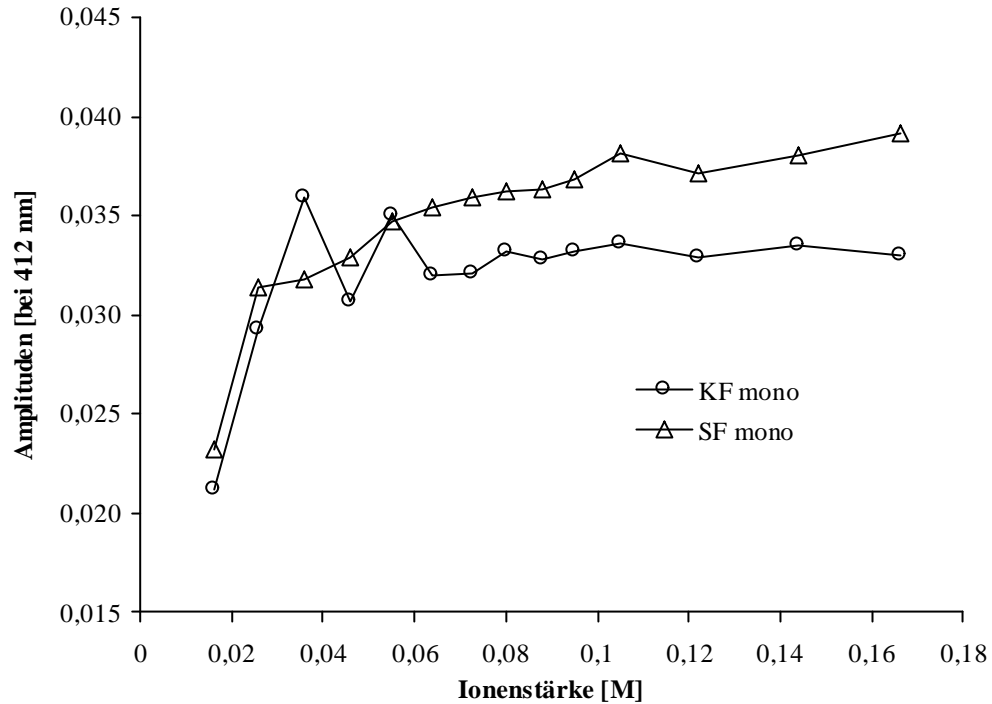


Abbildung 4.20: Auftragung der Amplituden der Elektronentransportreaktionen zwischen Cytochrom c_1 (KF/SF) und Cytochrom c_{552} in Abhängigkeit der Ionenstärke.

Ein sehr ähnliches Bild ergibt sich nach der biexponentiellen Datenanpassung bei der Auftragung der Summe der Amplituden ($\text{amp}^{\text{slow}} + \text{amp}^{\text{fast}}$) (Daten nicht gezeigt).

Hieraus ist ersichtlich, dass die Amplituden maßgeblich unabhängig von der Ionenstärke sind, was wiederum bedeutet, dass die Gleichgewichtskonstante K_{EQ} der Elektronentransportreaktion zwischen Cytochrom c_1 und Cytochrom c_{552} ebenfalls unabhängig von der Ionenstärke ist.

Daraus lässt sich ableiten, dass weiterhin sowohl ΔE° als auch ΔG° keine Abhängigkeit der Ionenstärke besitzen, denn es gilt:

$$\Delta G^\circ = R \cdot T \cdot \ln K_{EQ} \quad (\text{Gleichung 4.4})$$

sowie

$$\Delta G^\circ = n \cdot F \cdot \Delta E^\circ \quad (\text{Gleichung 4.5})$$

Weiterhin wurde die Ionenstärkeabhängigkeit der Reaktion zwischen den beiden löslichen Fragmenten des Cytochrom c_1 und Cytochrom c_{550} bestimmt. Hierfür musste zunächst

durch ein Doppelsektor-Küvetten-Experiment die exakte Wellenlänge für den idealen Messbereich der Wechselwirkung zwischen Cytochrom c_1 und Cytochrom c_{550} bestimmt werden. Diese lag bei 410 nm.

In diesem Experiment war es aufgrund sehr hoher Wechselzahlen und sehr geringer Amplituden nur möglich, die Rohdaten nach einer monoexponentiellen Funktion anzupassen. Die Daten hierzu sind in folgender Tabelle zusammengefasst.

Ionenstärke [mM]	k_{obs} (KF) [s ⁻¹]	Datenpunkte [von bis]	k_{obs} (SF) [s ⁻¹]	Datenpunkte [von bis]
16	399	3-200	330	5-60
26	n.b.		557	6-65
36	548	3-100	540	6-100
46	399	5-100	488	7-100
55	306	5-200	394	7-100
64	249	5-200	320	7-100
72	155	5-400	218	7-100
80	263	6-200	168	8-100
88	172	4-200	165	8-100
95	122	4-200	222	9-60
105	116	7-200	140	9-100
122	62	9-400	91	9-190
144	41	20-400	77	14-400
166	39	30-400	55	14-400

Tabelle 4.16: Geschwindigkeiten des Elektronentransportes zwischen löslichen Fragmenten von Cytochrom c_1 (KF/SF) und Cytochrom c_{550} in Abhängigkeit der Ionenstärke. Die Daten wurden hierbei nach einer Monoexponentialfunktion angepasst.

Auch hier wurden die angepassten Werte für k_{obs} gegen die Ionenstärke aufgetragen. Es ergab sich folgende Abbildung:

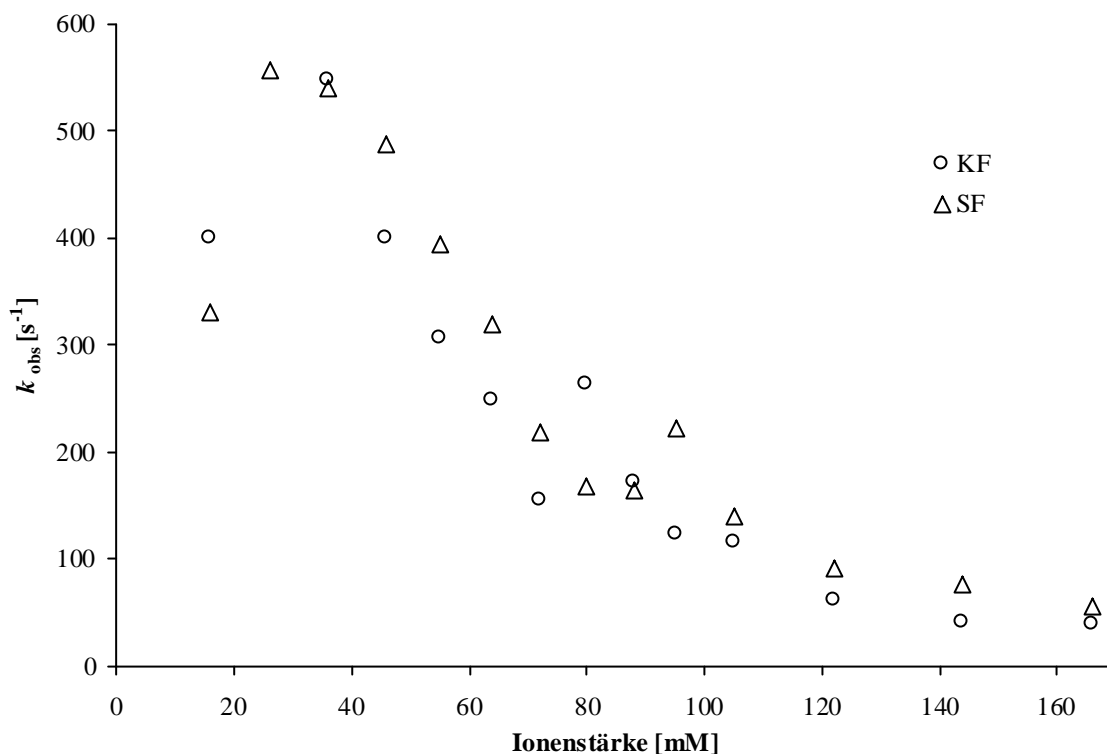


Abbildung 4.21: Ionenstärkeabhängigkeit der Geschwindigkeit des Elektronentransportes zwischen löslichen Fragmenten des Cytochrom c_1 (KF und SF) und Cytochrom c_{550} im *pre-steady-state*-Bereich. Die Daten wurden nach einer monoexponentiellen Funktion angepasst.

Analog der vorangegangenen Untersuchungen wurde die Daten der Untersuchungen zur Ionenstärkeabhängigkeit zwischen Cytochrom c_1 (KF und SF) und Cytochrom c_{550} nach der Brønsted-Gleichung mit einer monoexponentiellen Funktion angepasst. Die Ergebnisse hierzu sind in folgender Tabelle zusammengefasst:

	KF	SF
k_{obs}^0	6339	3681
$\log(k_{\text{obs}}^0)$	3.8	3.5
$A_{\text{Z}_A \text{ Z}_B}$	- 5.5	- 4.4
r	0.975	0.98

Tabelle 4.17: Ergebnisse aus den nach der Brønsted-Gleichung aufgetragenen Datensätze (Brønsted Plot) der Reaktion zwischen Cytochrom c_1 und Cytochrom c_{550} . Die Anpassung erfolgte hierbei nach einer monoexponentiellen Funktion. r = Korrelationskoeffizient.

Analog der Untersuchungen der Ionenstärkeabhängigkeit zwischen Cytochrom c_1 und Cytochrom c_{552} wurde auch für die Wechselwirkung zwischen KF und SF mit Cytochrom c_{550} die apparente bimolekulare Geschwindigkeitskonstante k_{on}^0 des Elektronentransportes durch Dividieren der Anfangskonzentration an Cytochrom c_{550} durch die gegen $I = 0$ extrapolierten Geschwindigkeiten der Reaktion (k_{obs}^0) bestimmt. Die Werte hierzu sind in folgender Tabelle zusammengefasst.

Reaktionspaar	k_{on}^0
$c_1 \text{ KF} - c_{550}$	$4.0 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
$c_1 \text{ SF} - c_{550}$	$1.4 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$

Tabelle 4.18: Werte für die apparente bimolekulare Geschwindigkeitskonstante k_{on}^0 des Elektronentransportes zwischen Cytochrom c_1 (KF und SF) und Cytochrom c_{550} . Die Daten wurden nach einer monoexponentiellen Funktion angepasst.

Die erhaltenen Werte liegen um eine Größenordnung über denen der Wechselwirkung zwischen Cytochrom c_1 und Cytochrom c_{552} (siehe Tabelle 4.15) und lassen daher noch überzeugender auf einen diffusionskontrollierten Prozess schließen.

Allgemein konnten für den Ionenstärkebereich zwischen 36 mM und 116 mM konstante Datensätze bestimmt werden. Für die Untersuchung der Ionenstärkeabhängigkeit einer elektrostatischen Wechselwirkung bietet sich ein Messbereich mittlerer Ionenstärke an, da bei erhöhten Ionenstärken ($> 100 \text{ mM}$) die Oberflächenladungen soweit abgeschirmt werden, dass diese keinen Einfluss mehr auf die Interaktion zweier wechselwirkender Proteine nehmen können. Aus diesem Grund wurde beschlossen, sämtliche kinetischen Untersuchungen bei Pufferbedingungen, die einer Ionenstärke von $I = 36 \text{ mM}$ entsprechen, durchzuführen.

4.2.4 Analytische Gelfiltration des Komplexes aus Cyt c_1 KF und Cyt c_{552}

Mittels der analytischen Gelfiltration können Proteine unterschiedlicher Größe aufgrund ihres unterschiedlichen Laufverhaltens im Gelbett einer Säule aufgetrennt werden. Die verwendeten Säulenmaterialien sind in der Lage, Moleküle je nach ihrer Größe selektiv festzuhalten. Lässt man eine Lösung mit einem Gemisch aus unterschiedlich großen

Makromolekülen (z. B. Proteinen) über eine Säule laufen, fließen die größeren Moleküle, die nicht in die Porenstruktur des Gels eindringen können schnell hindurch, während die kleineren Moleküle erst nach einer gewissen Verweilzeit die Säule passieren. Die relative Molekülmasse lässt sich daher durch den Vergleich der Elutionszeit von einer Säule mit einem bekannten Standard errechnen. Die Retentionszeit ist jedoch nicht nur von der Masse, sondern auch von der Form der Moleküle abhängig. Die Methode eignet sich daher am besten für kugelförmige (sphärische) Moleküle.

Es sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob die beiden löslichen Fragmente Cytochrom c_1 KF und Cytochrom c_{552}' einen stabilen Komplex ausbilden. Die Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Vladimir Rogov (Institut für Biophysikalische Chemie, Universität Frankfurt/Main) durchgeführt.

Im ersten Versuchsansatz wurden die Proteinlösungen mit einem Phosphatpuffer (20 mM KPi pH 8.0, 20 mM NaCl, 1 mM EDTA) jeweils auf eine Konzentration von 5 μM eingestellt. Es wurden zunächst beide Monomere einzeln auf die Säule (Superdex-75) aufgetragen und bei 18 °C mit einer Durchflussrate von 0.5 ml/min. eluiert (Pharmacia LKB, FPLC System). Daraufhin wurde ein Gemisch der beiden Fragmente (Cyt c_1 : Cyt c_{552} = 1 : 1.5) hergestellt und ebenfalls unter den gleichen Bedingungen aufgetragen und eluiert. Die Elutionsprofile der einzelnen Messungen wurden mit Hilfe einer UV-Detektionseinheit erfasst. Es zeigte sich, dass die Mischung der beiden Proteine im Vergleich zu den Monomer-Läufen zu keiner Verschiebung der Peaks des Elutionsprofils führte (Daten nicht gezeigt).

In einem zweiten Versuchsansatz wurden daraufhin die Pufferbedingungen an den spektroskopischen Aktivitäts-Tests von Cytochrom c_{552} und Cytochrom- c -Oxidase angepasst (20 mM Tris/HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, 0.2 g/l DM). Es wurde hierbei analog zu dem ersten Ansatz vorgegangen. Es zeigte sich jedoch, dass die beiden Fragmente auch unter den veränderten Versuchsbedingungen (erniedrigte Ionenstärke, erniedrigter pH) keinen nachweisbaren Komplex ausbilden (Daten nicht gezeigt).

4.2.5 Analytische Ultrazentrifugation des Komplexes aus Cyt c_1 KF und Cyt c_{552}

Ausgehend von den Ergebnissen aus der analytischen Gelfiltration sollte untersucht werden, ob sich ein stabiler Komplex aus Kernfragment und Cytochrom c_{552} mittels analytischer Ultrazentrifugation nachweisen lässt.

Die Untersuchungen wurden von Herrn Dr. Gottfried Mayer (Institut für Biophysik, Frankfurt/Main) mit einer analytischen Ultrazentrifuge mit Absorptionsoptik (Optima XL-A, Beckmann Instruments) durchgeführt.

Die Proteinlösungen wurden hierbei jeweils in einem Puffer niedriger Ionenstärke (20 mM Tris/HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA) auf eine Endkonzentration von 2 μ M verdünnt. Es wurde zunächst ein Sedimentations-Geschwindigkeits-Lauf bei 40000 rpm für 6 Stunden und anschließend ein Sedimentations-Gleichgewichts-Lauf bei 40000 rpm über 36-48 Stunden durchgeführt. Der erste Versuchsansatz bei 20 °C führte zu keinem reproduzierbaren Ergebnis. Das Cytochrom c_1 Fragment (KF) konnte nach 20 Stunden nicht mehr im Bereich seines ursprünglichen Molekulargewichtes nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Ein solches Ergebnis spricht für eine Denaturierung des Proteins und deckt sich mit den Ergebnissen, die bei der Untersuchung zur Temperaturstabilität von KF erzielt wurden (siehe 4.2.6). Die Versuchstemperatur wurde daraufhin auf 4 °C abgesenkt. Unter diesen Bedingungen wurde für das Kernfragment ein Molekulargewicht von \sim 25 kDa und für Cytochrom c_{552} ein Molekulargewicht von \sim 10 kDa bestimmt. Diese Ergebnisse decken sich sehr gut mit den aus der Aminosäuresequenz errechneten Molekulargewichten beider Proteine.

Während des Zentrifugationslaufes der äquimolaren Mischung beider Fragmente konnte zu keinem Zeitpunkt ein zusätzliches Signal bei einem Molekulargewicht von \sim 30 kDa, welches einem stabilen Komplex aus Cyt c_1 KF und Cyt c_{552} entsprochen hätte, nachgewiesen werden. Auch ein Versuchsansatz, bei dem höhere Konzentrationen beider Fragmente eingesetzt wurden, führte nicht zur Ausbildung bzw. Nachweisbarkeit eines Heterodimers beider Cytochrome.

4.2.6 Thermostabilität des Kernfragments

Die Thermostabilität des löslichen Kernfragments des Cytochrom c_1 aus *P. denitrificans* wurde mit Hilfe der Differentiellen Scanning Kalorimetrie (DSC) untersucht. Hierbei wurde die thermische Denaturierung des löslichen Fragments in einem Temperaturbereich von 15-90 °C verfolgt. Um zu überprüfen, ob es sich bei dem Schmelzvorgang um einen reversiblen Prozess handelt, wurde das Experiment mit jeder Probe zweimal hintereinander wiederholt. Es konnte gezeigt werden, dass sich das Kernfragment in der reduzierten Form bereits bei Temperaturen um 40 °C zu entfalten beginnt. Bei 60 °C ist das Protein schließlich vollständig denaturiert.

In zweiten Durchlauf zeigte die Schmelzkurve der gleichen Probe ein wesentlich niedrigeres Maximum, was dafür spricht, dass die Denaturierung des Fragments irreversibel ist, da sich nur ein Teil des Proteins nach dem Abkühlen zurückfaltet. Zudem erschien die Schmelzkurve sehr breit und flach. Die mathematische Analyse der Daten ergab, dass sich der Phasenübergang (nativ → denaturiert) bei geringeren Konzentrationen (2mg/ml) am besten durch ein Zweiphasen-Modell beschreiben lässt (Daten nicht gezeigt). Bei höheren Konzentrationen (6 mg/ml) zeigte sich jedoch, dass es einen Intermediärzustand gibt.

Die folgende Abbildung zeigt im oberen Teil einen Rohdaten-Verlauf während des DSC-Experimentes und im unteren Teil die daraus berechnete Verteilung der Populationen (nativ/denaturiert) in Abhängigkeit von der Temperatur.

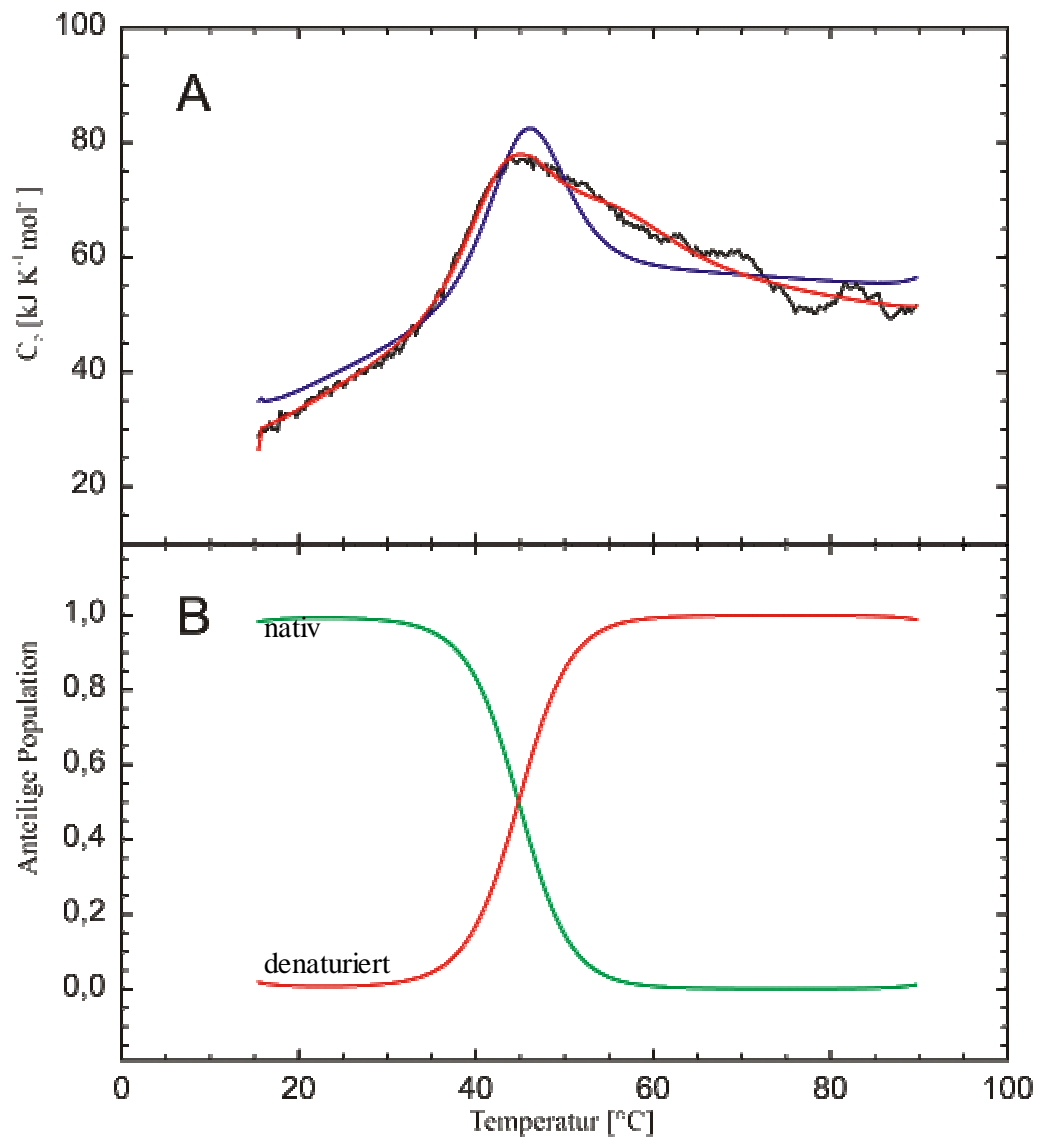


Abbildung 4.22: Thermostabilität des *P. denitrificans* Cytochrom c_1 (KF). Die Konzentration des Fragments lag während des Versuchs bei 6 mg/ml. **A:** Der Rohdaten-Verlauf (schwarze Linie) ließ sich anhand einer Anpassung der Daten nach einem „Zwei-Phasen“-Modell (blaue Linie) und mit einer Anpassung nach einem „Intermediärzustands“-Modell (rote Linie) am besten abbilden. **B:** Anhand der Datenanpassung konnte die Verteilung der Populationen (nativ/denaturiert) in Abhängigkeit von der Temperatur bestimmt werden.

4.2.7 Homonukleare NMR Messungen

Die NMR Spektroskopie dient der Strukturaufklärung von Proteinen. Zur Ermittlung der Tertiärstruktur eines Proteins müssen die bestimmten NMR Resonanzen vollständig zugeordnet werden. Jedes Atom muss hierbei zu den ermittelten NMR Signalen in Korrelation gebracht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte versucht werden, mittels NMR Spektroskopie strukturelle Informationen über das Cytochrom c_1 Kernfragments aus *P. denitrificans* zu erlangen. Hierzu wurden multidimensionale homonukleare NMR-Messungen durchgeführt.

Zur Probenvorbereitung wurden 50-100 mg aufgereinigtes Cytochrom c_1 (KF) in 20 mM KPi pH 5.7 umgepuffert, mit Na-Dithionit reduziert und auf ein Volumen von 500 μl eingengt (entspricht 2 bis 4 mM). Die Proben wurden mit 5-10 % D_2O versetzt, mit einer am Bunsenbrenner ausgezogenen Glaspipette in ein NMR-Röhrchen überführt und mit Argon überschichtet. Schließlich wurde TMS als interner Standard zugegeben, dessen Methyl-Protonenresonanz definitionsgemäß bei 0 ppm liegt.

Im 1D Spektrum wurde deutlich, dass das Protein viele helikale Bereiche besitzt, jedoch keine β -Faltblätter aufweist (Daten nicht gezeigt). Der Spektrenbereich war sehr breit, was man für den reduzierten Zustand nicht erwartet hätte, da das Häm in der reduzierten Form nicht paramagnetisch ist. Die Signale waren zudem allesamt sehr breit, was für eine hohe Beweglichkeit des Proteins spricht. Eine Zuordnung war nicht möglich. Auch im 2D NOESY war keine Zuordnung möglich. Aufgrund der relativen Größe des Proteins und der vermuteten hohen Beweglichkeit, wäre hier eine mindestens zweifache Markierung (^{15}N und ^{13}C) notwendig, favorisiert wäre eine dreifache Markierung (^{15}N und ^{13}C und ^2H) gewesen. Da sich das Protein allerdings in nicht ausreichenden Ausbeuten exprimieren ließ, wurde von diesem Vorhaben abgesehen.

4.2.8 Redox titrationen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Mittelpunktspotential des Kernfragments von Cytochrom c_1 bestimmt. Die Messungen wurden von Frau Michaela Ritter am Institut für Biophysik in Frankfurt durchgeführt. Hierzu wurde eine Probe des löslichen Fragments in Phosphat-Puffer (200 mM KP_i pH 7.0, 100 mM KCl) gelöst. Die Potentialtitration wurde in beiden Richtungen zwischen -0.4 V und +0.4 V in Schritten zu 0.5 mV bei 5 °C durchgeführt, und mit einem FT-IR Spektrometer (modifizierter IFS25; Fa. Bruker) detektiert. In der folgende Abbildung ist die Änderung der Absorption des Proteins in Abhängigkeit des Potentials dargestellt.

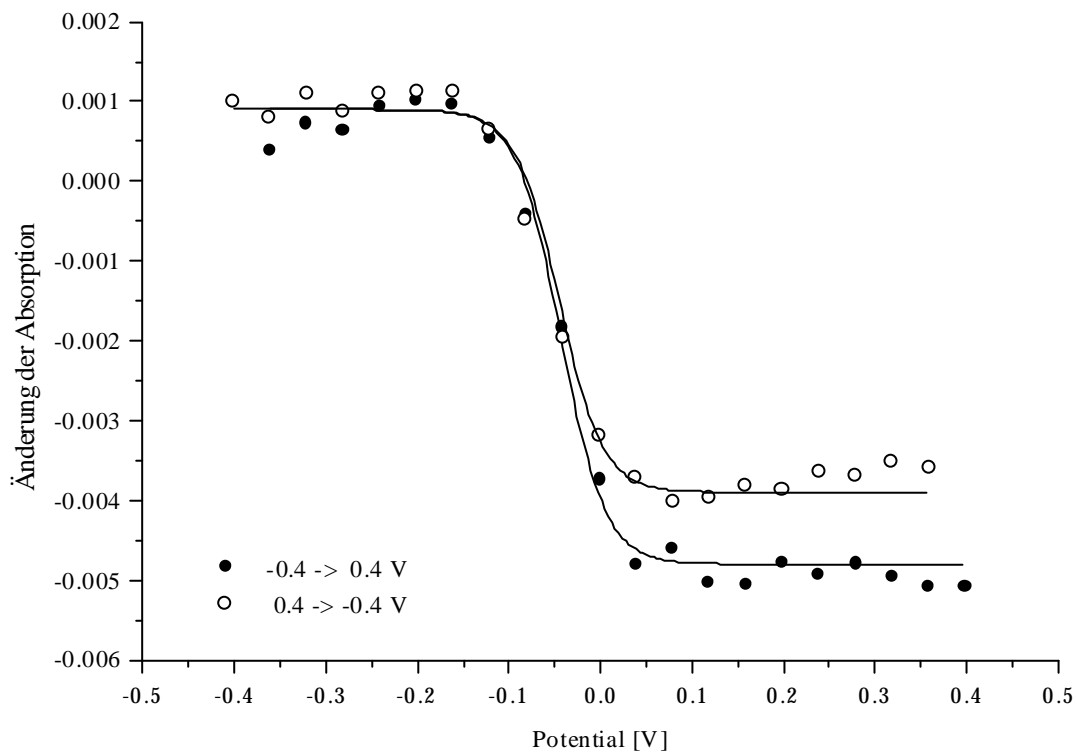


Abbildung 4.23: Potentialtitration des löslichen Cytochrom c_1 (KF) aus *P. denitrificans*. Die gefüllten Datenpunkte stellen dabei die Titration von -0.4 V nach +0.4 V, die ungefüllten Datenpunkte die Messung von +0.4 V nach -0.4 V dar. Aus dem Wendepunkt der Kurve lässt sich das Mittelpunktspotential bestimmen.

Aus dem Wendepunkt der ermittelten Titrationskurve lässt sich das Mittelpunktspotential bestimmen. Für das Cytochrom c_1 Kernfragment von *P. denitrificans* konnte anhand der

durchgeführten Messung ein Redoxpotential von -45 mV (gegen Ag/AgCl) bestimmt werden. Möchte man diesen Wert auf die Normal-Wasserstoff-Elektrode normieren, ergibt sich ein Potential von 163 mV. Für das Redoxpotential des Cytochrom c_1 innerhalb der bc_1 -Komplexes von *P. denitrificans* lag dieses zwischen 268 und 308 mV (Michaela Ritter, persönliche Mitteilung, 2003). Diese Differenz der Redoxpotentiale zwischen löslichem Kernfragment und im bc_1 -Komplex assoziierten „full size“-Cytochrom c_1 wurde auch schon für andere Systeme beschrieben (Petra Hellwig, persönliche Mitteilung, 2002). Sie lässt sich auf ein verändertes Umfelds zurückführen, welches auf dem Herauslösen einer Untereinheit aus dem Komplex beruht.

4.2.9 Kinetische Untersuchungen an Mutanten des Cytochrom c_1 Kernfragments

Nachdem ein reproduzierbares Messsystem für die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten des Elektronentransportes von Cytochrom c_1 und Cytochrom c_{552} etabliert worden war (siehe 4.2.2), sollten die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Mutanten des Kernfragments ebenfalls kinetisch charakterisiert werden. Die aufgereinigten Mutanten wurden im Vorfeld durch Redox-Differenzspektren auf ihren Hämgehalt und die Funktionalität der prosthetischen Gruppe hin untersucht. Hierbei fiel auf, dass die vier Konstrukte E355Q, E355K, E354Q und E354K ein nach rechts verschobenes Redox-Differenzspektrum aufwiesen. Wie sich später herausstellte, zeigten die Derivate von Glutamat 355 und Glutamat 354 ein ungewöhnliches Verhalten bei den Stopped-Flow-Untersuchungen. Die gemessenen Kinetiken erschienen triphasisch (Daten nicht gezeigt), und wurden daher nicht für eine vergleichende Auswertung in Betracht gezogen.

Zusätzlich zu den elf im Rahmen dieser Arbeit aufgereinigten Mutanten wurden noch fünf weitere Konstrukte des Cytochrom c_1 in ihrer Wechselwirkung mit Cytochrom c_{552} untersucht. Die Mutanten E288Q, E288K, D289K, D380N und D380K wurden von Julia Janzon im Rahmen einer Diplomarbeit hergestellt (Janzon, 2001) und sollten ebenfalls im *pre-steady-state*-Bereich charakterisiert werden.

Analog zu den in 4.2.2 beschriebenen Ergebnissen wurden die Geschwindigkeitskonstanten aller anderen in dieser Arbeit hergestellten Mutanten des Cytochrom c_1 Kernfragments durch *pre-steady-state*-Kinetiken bestimmt. Die Datenanpassung erfolgte hierbei grundsätzlich mit einer Biexponentialfunktion. Im Vorfeld wurde durch Doppelsektor-Küvetten-Experimente überprüft, ob sich die für die Reaktion der Wildtyp Fragmente SF und KF bestimmten Wellenlängen (412 und 424.6 nm) ebenfalls für die Messung der Mutanten mit Cytochrom c_{552} eignen. Dieses konnte bestätigt werden.

Analog zu den in 4.2.2 beschriebenen Versuchen wurden daraufhin durch simultane Datenanpassung bei 412 und 424.6 nm Werte für k_{obs} bei jeweils fünf verschiedenen Cytochrom c_{552} Konzentrationen bestimmt. Die Temperatur lag bei 3.6 °C, die Ionenstärke bei 36 mM.

Im Falle von E288Q und E288K war es nicht möglich, die erhaltenen Rohdaten nach einer biexponentiellen Funktion anzupassen. Der Verlauf der Rohdaten war eindeutig

monophasisch. Zudem zeigten diese beiden Mutanten eine gegenüber dem Wildtyp signifikant erhöhte Geschwindigkeitskonstante.

Aus Gründen der Überschaubarkeit sei an dieser Stelle exemplarisch die grafische Darstellung der Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante k_{on} durch die Auftragung von k_{obs} in Abhängigkeit von der Substratkonzentration einiger Mutanten im Vergleich zum Wildtyp gezeigt.

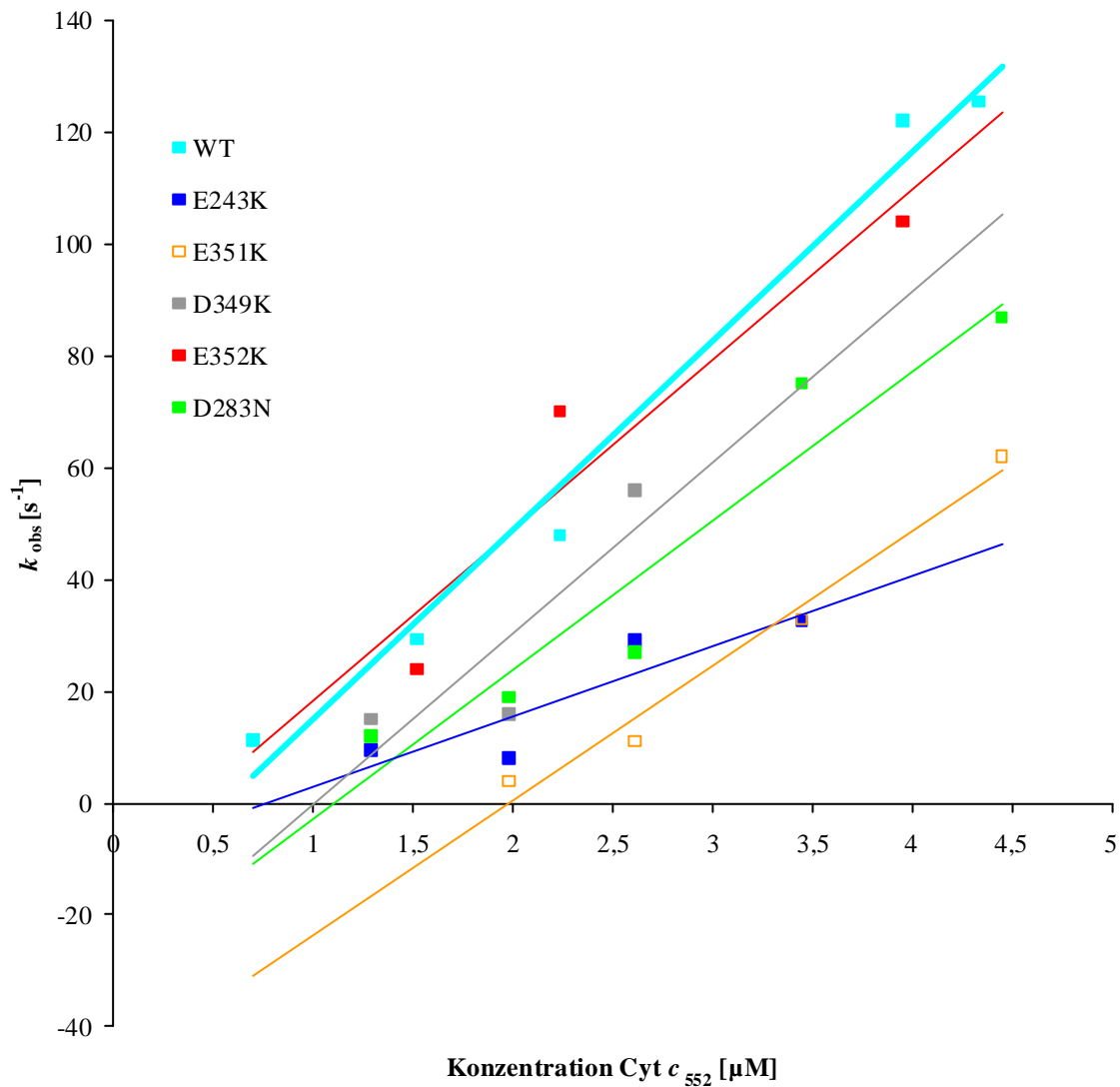


Abbildung 4.24: Auftragung von k_{obs} gegen die jeweilige Cytochrom c_{552} Konzentration. Es sind hier die Ergebnisse der Messung verschiedener Mutanten des Cytochrom c_1 Kernfragments aus *P. denitrificans* im Vergleich zum Wildtyp aufgetragen. Die Werte für die Geschwindigkeitskonstante k_{on} werden jeweils durch die Steigung der angelegten Regressionsgeraden ermittelt. Die Regressionsgerade des Wildtyp-Fragments ist fett eingezeichnet.

Die Ergebnisse zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante k_{on} sämtlicher Messungen sind in folgender Tabelle zusammengefasst:

Cyt c_1	$k_{\text{on}}^{(\text{slow})}$	%	$k_{\text{on}}^{(\text{mono})}$	%
Konstrukt	[M⁻¹s⁻¹]	vom WT	[M⁻¹s⁻¹]	vom WT
WT (KF) vs. c_{552}	$3.38 \cdot 10^7$	100	$7.9 \cdot 10^7$	100
E243Q vs. c_{552}	$2.63 \cdot 10^7$	78		
E243K vs. c_{552}	$1.25 \cdot 10^7$	36		
N278D vs. c_{552}	$(1.1 \cdot 10^8)$	(325)		
D283N vs. c_{552}	$2.6 \cdot 10^7$	76		
E288Q vs. c_{552}	-	-	$1.56 \cdot 10^8$	197
E288K vs. c_{552}	-	-	$2.2 \cdot 10^8$	278
D289K vs. c_{552}	$1.0 \cdot 10^8$	295		
D349K vs. c_{552}	$3.0 \cdot 10^7$	88		
E351K vs. c_{552}	$2.4 \cdot 10^7$	71		
E352K vs. c_{552}	$3.0 \cdot 10^7$	88		
D380N vs. c_{552}	$3.5 \cdot 10^7$	105		
D380K vs. c_{552}	$7.24 \cdot 10^7$	214		

Tabelle 4.19: Werte für die Geschwindigkeitskonstante $k_{\text{on}}^{\text{slow}}$ bzw. $k_{\text{on}}^{\text{mono}}$ der Reaktion von Cytochrom c_1 (Kernfragment) mit Cytochrom c_{552} . Vergleich zwischen Wildtyp und Mutanten des Kernfragments. Die Werte für k_{on} für das Wildtyp-Fragment wurden zu 100% gesetzt und alle mutierten Konstrukte jeweils auf den Wildtyp bezogen. Im Falle von E288Q und E288K war nur eine monoexponentielle Datenanpassung möglich. Diese beiden Konstrukte wurden auf den Wert für $k_{\text{on}}^{\text{mono}}$ des Wildtyps bezogen.

Bei der Betrachtung der Daten wird deutlich, dass die Mutanten im Vergleich zum Wildtyp größtenteils nur leicht herabgesetzte Geschwindigkeitskonstanten aufweisen. Keines der hergestellten Proteine war in seiner Wechselwirkung zum löslichen Fragment des Cytochrom c_{552} vollständig inaktiviert.

Die drei benachbarten Mutanten D349K, E351K und E352K zeigen eine leicht herabgesetzte Aktivität, die vergleichbar mit den Werten, die für D283K und E243Q bestimmt wurden, sind.

Den stärksten Effekt zeigte E243K (Reduktion auf 36 %). Die Mutante D380N hingegen hat Wildtyp-Aktivität.

Die Mutanten D380K und D289K zeigten sehr schnelle Kinetiken und damit auch deutlich erhöhte Geschwindigkeitskonstanten gegenüber dem Wildtyp des Kernfragments. Die Rohdaten der Mutante N278D zeigten keinen reproduzierbaren Verlauf. Aus diesem Grund wurden diese auch nicht zur Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen Cytochrom c_1 und Cytochrom c_{552} herangezogen (siehe Diskussion). Die beiden Derivate von Glutamat 288 waren in ihrer Reaktion mit Cytochrom c_{552} so schnell, dass ein Großteil der Reaktion bereits innerhalb der Totzeit des Gerätes abgelaufen war, so dass die Werte für k_{obs} zum Teil nur noch durch eine Extrapolation gegen $t = 0$ ermittelt werden konnten. E288Q und E288K zeigten zudem einen eindeutig monophasischen Kurvenverlauf. Ein solcher Rohdaten-Verlauf sei hier exemplarisch für E288Q bei einer Cytochrom c_{552} Konzentration von 2.5 μM gezeigt.

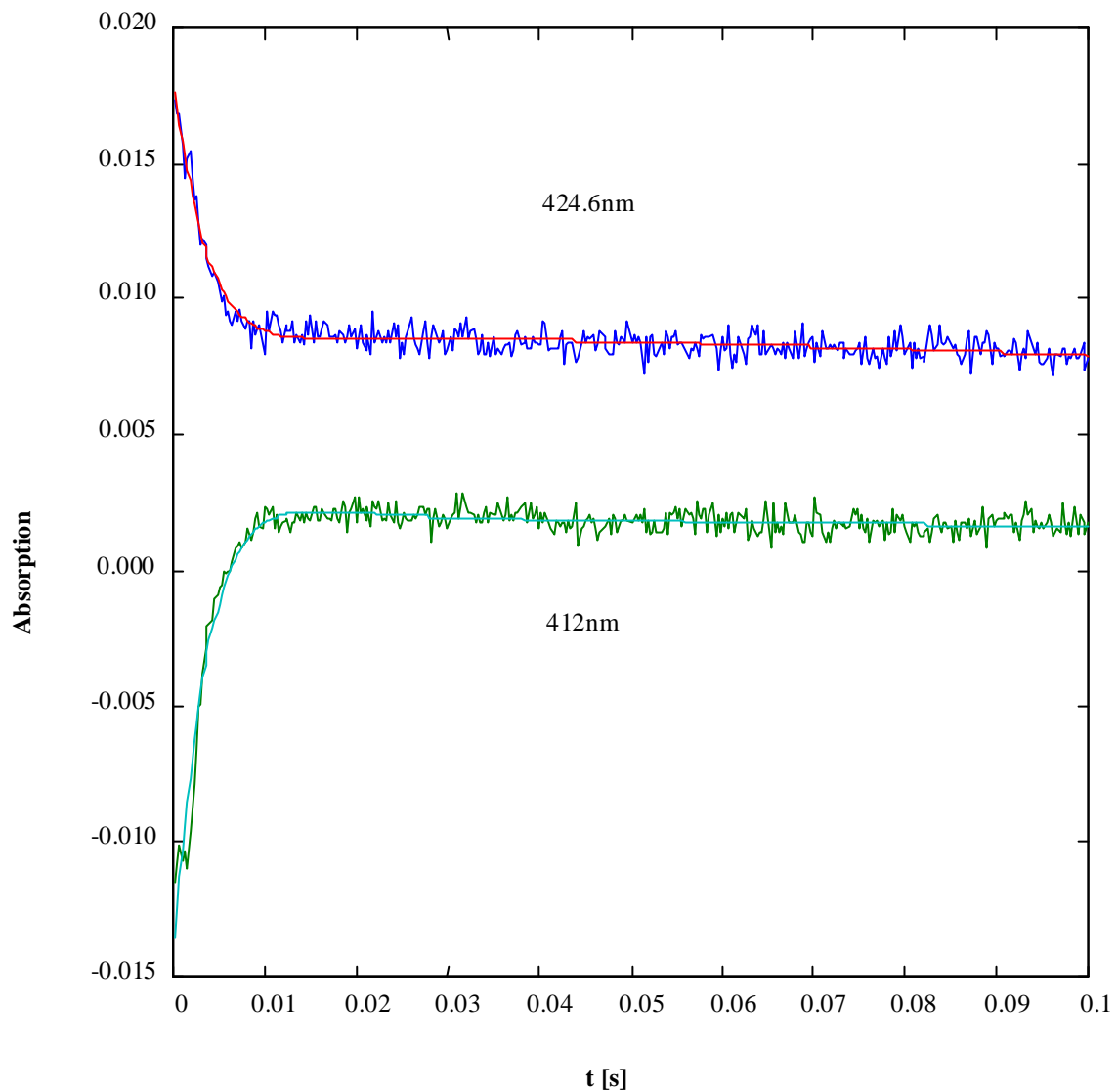


Abbildung 4.27: Simultane Datenanpassung für die Reaktion zwischen Cytochrom c_1 (E288Q) und Cytochrom c_{552} bei 424.6 nm und 412 nm.

Zusammenfassend zeigt somit nur die Mutation an Position E243 einen signifikanten Effekt auf die Geschwindigkeitskonstante k_{on} der Reaktion zwischen Cytochrom c_1 und Cytochrom c_{552} . Es konnte jedoch kein einzelner exponierter Aminosäurerest identifiziert werden, dessen Veränderung zu einer vollständigen Einschränkung der Aktivität des Kernfragments führte.

5. Diskussion

Es ist in dieser Arbeit gelungen, zwei lösliche Fragmente (siehe Abbildung 1.6) des Cytochrom c_1 aus *P. denitrificans* herzustellen und heterolog in *E. coli* zu exprimieren. Für das saure Fragment (SF) wurde lediglich der Membrananker deletiert, während das Kernfragment (KF) durch die zusätzliche Deletion der sauren Domäne als eine Art minimalisiertes Cytochrom c_1 anzusehen ist. Beide Fragmente konnten nach erfolgreicher Aufreinigung funktionell charakterisiert werden. Die im voran gegangenen Kapitel beschriebenen Ergebnisse sollen im folgenden diskutiert werden.

Zur besseren Übersicht wurde dieses Kapitel analog zu dem vorangegangenen in zwei Teile untergliedert. Im ersten soll gezielt auf die Herstellung und Aufreinigung der untersuchten Fragmente eingegangen werden. Im zweiten Teil werden die Ergebnisse der funktionellen Charakterisierung diskutiert.

5.1 Expression und Aufreinigung

Wie bereits beschrieben, sollten im Rahmen dieser Arbeit zwei lösliche Fragmente des Cytochrom c_1 aus *P. denitrificans* heterolog in *E. coli* exprimiert und chromatographisch aufgereinigt werden. Im Gegensatz zu allen anderen bc_1 -Komplexen besitzt das Cytochrom c_1 -Genprodukt aus *P. denitrificans* eine zusätzliche N-terminale Domäne, die eine außergewöhnlich saure Aminosäurezusammensetzung aufweist (Kurowski und Ludwig, 1987). Diese saure Domäne wird in anderen Organismen durch zusätzliche Untereinheiten innerhalb des bc_1 -Komplexes dargestellt, die in direkter Assoziation mit dem Cytochrom c_1 vorliegen (Kim und King, 1983; Kim *et al.*, 1987; Otha *et al.*, 1987). Die Funktion eines solchen sauren Strukturelements könnte in einem regulatorischen Einfluss der elektrostatischen Wechselwirkung zwischen bc_1 -Komplexen und ihren Substraten zu sehen sein.

Bis dato konnte für *Paracoccus* jedoch noch kein eindeutiger Beweis für eine Beteiligung dieser sauren Domäne an der Wechselwirkung zwischen bc_1 und den Substraten des Komplexes geführt werden. Zudem ist die Struktur des bc_1 -Komplexes aus *P. denitrificans* bis heute nicht gelöst.

Aus diesem Grund sollte die physiologische Funktion der sauren Domäne des Cytochrom c_1 aus *P. denitrificans* untersucht werden. Die funktionelle Charakterisierung sollte zum einen durch kinetische Untersuchungen, zum anderen durch Versuche zum Nachweis eines stabilen Komplexes zwischen Cytochrom c_1 und Cytochrom c_{552} erfolgen.

Sowohl für kinetische Untersuchungen, als auch zur weiteren funktionellen Charakterisierung, eignen sich membranständige Enzyme weniger gut als lösliche Proteine. Aus diesem Grund sollten lösliche Fragmente des Cytochrom c_1 hergestellt werden.

5.1.1 Konstruktion und Expression löslicher Fragmente des Cytochrom c_1 aus *Paracoccus denitrificans*

Die Herstellung der beiden löslichen Fragmente des Cytochrom c_1 stellte den ersten Teil und eine wichtige Voraussetzung für diese Arbeit dar. Es soll hier im einzelnen auf die erzielten Ergebnisse bei der Konstruktion und Expression der löslichen Fragmente des Cytochrom c_1 eingegangen werden.

5.1.1.1 Konstruktion und Klonierung der Fragmente

Wie bereits beschrieben wurden zwei verkürzte Fragmente des Cytochrom c_1 aus dem *fbc*-Operon heraus amplifiziert und in ein zur heterologen Expression befähigtes System (pET-Expressionssystem der Fa. Novagen) kloniert. Bei der Planung von KF musste durch PCR ein neues Startcodon *in frame* eingebracht werden. Mit dem Reverse-Primer wurde in beiden Fällen (KF und SF) ein Stopcodon vor den Beginn des Membranankers gesetzt. Die Herstellung der beiden pET-Derivate verlief unproblematisch und wurde anschließend durch Restriktionskartierung und Sequenzierung überprüft.

5.1.1.2 Heterologe Expression in E. coli

Aufgrund einer allgemein sehr geringen Basalexpression von *c*-Typ Cytochromen in *P. denitrificans* wurde beschlossen, die beiden Cytochrom c_1 Fragmente im Rahmen dieser Arbeit heterolog in *E. coli* zu exprimieren. Die beiden löslichen Konstrukte des Cytochrom c_1 (KF und SF) zeigten hierbei ein sehr unterschiedliches Expressionsverhalten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Versuche unternommen, die Expressionsraten der doppelresistenten Stämme zu optimieren (siehe hierzu 4.1.7, insbesondere Tabelle 4.3).

Grundsätzlich zeigte der Wildtypstamm AE2 (Kernfragment) eine wesentlich bessere Expressionsausbeute als der Wildtypstamm AE4 (saures Fragment). Gründe hierfür sind in der Natur der beiden Genprodukte KF und SF zu suchen. Das saure Fragment besitzt ein Molekulargewicht von 40.5 kDa und eine im Vergleich zum Kernfragment wesentlich stärker negative Oberflächenladung. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die *E. coli* Zellen ein solches saures Protein nicht überexprimieren. Zudem könnte die unterschiedliche Größe der beiden Fragmente zu dem voneinander abweichenden Expressionsverhalten geführt haben. Die heterologe Expression eines Proteins kann durch einen Mangel an bestimmten tRNA-Molekülen im Wirtsorganismus erschwert werden. *P. denitrificans* verfügt über eine andere „codon-usage“ (Steinrücke und Ludwig, 1993) als *E. coli* (McPherson, 1988; McLachlan *et al.*, 1984). Aus diesem Grund kann es bei der Translation einer mRNA aus *P. denitrificans* in *E. coli* zu Engpässen der jeweils passenden tRNA kommen. Die geringere Größe eines in einem Fremdorganismus synthetisierten Proteins korreliert mit einer geringeren Anzahl an möglichen seltenen Codons. Aus diesem Grund könnten sich kleinere Proteine besser heterolog exprimieren lassen, als größere. Das Kernfragment besitzt ein um die Hälfte verringertes Molekulargewicht im Vergleich zum sauren Fragment (23.7 kDa) und weist zudem eine wesentlich weniger negative Oberflächenladung auf. Somit stellt dieses Genprodukt ein für die *E. coli* Zellen unproblematischer zu exprimierendes Protein dar, was der Grund dafür sein kann, dass sich Cytochrom *c*₁ KF im Gegensatz zu SF bis zu einer Konzentration von 8 mg/Liter Kulturmedium überexprimieren ließ.

Ein weiteres Kriterium für die erfolgreiche heterologe Expression der beiden Cytochrom *c*₁ Fragmente ist der vollständige Hämeinbau und die kovalente Verknüpfung der prosthetischen Gruppe im Apoprotein.

Um den Hämeinbau in ein in *E. coli* exprimiertes Cytochrom *c*₁ aus *P. denitrificans* zu ermöglichen, wurde das Expressionssystem (*E. coli* BL21 (DE3) + pET_Cyt *c*₁) durch eine Co-Transformation mit pEC 86, welcher die Hämreifungs-Gene von *E. coli* trägt, komplementiert. Ein erfolgreicher Hämeinbau konnte für SF und KF durch Hämfärbung nachgewiesen werden. Beide Fragmente zeigten schließlich eine reproduzierbare Hämexpression.

Das Temperaturoptimum für die Anzucht von *E. coli* liegt bei 37 °C. Bei dieser Temperatur konnte das Minimalfragment in seiner Expressions- und Hämeinbaurate

optimiert werden. Im Falle von SF konnte die beste Hämeinkorporation durch eine Erniedrigung der Anzuchtstemperatur auf 32 °C erzielt werden. Die Gründe warum eine erniedrigte Temperatur beim sauren Fragment zu einer verbesserten Hämexpression führte, liegen auf der Hand. Die extreme Häufung negativer Oberflächenladungen auf dem sauren Fragment macht dieses zu einem Angriffspunkt für intrazelluläre Proteasen von *E. coli*, da eine Abfolge mehrerer saurer Aminosäuren hintereinander eine gängige Erkennungssequenz für Proteasen ist. Die Expressionsraten des sauren Fragments des Cytochrom *c*₁ (SF) lagen aus diesem Grund deutlich unter denen des KF. Durch eine Erniedrigung der Temperatur werden die meisten Prozesse innerhalb einer Zelle verlangsamt. Unter diesen Bedingungen könnte es durch die herabgesetzte Aktivität der intrazellulären Proteasen bei gleichzeitig verlangsamer Teilungsrate der Zellen zu einem günstigeren Verhältnis zwischen neu synthetisiertem und proteolytisch abgebautem Apoprotein kommen.

Durch die Versuche einer Anzucht in zweifach konzentriertem LB-Medium sowie die Zugabe von Glycerin oder γ -Aminolävulinsäure konnte gezeigt werden, dass der limitierende Faktor einer erfolgreichen Häminkorporation nicht die Nährstoffzufuhr bzw. eine erhöhte Teilungsrate der Zellen ist. Die Prozesse der Hämreifung in dem verwandten pET/pEC-Expressionssystem scheinen vielmehr von der Natur des jeweiligen Apoproteins abhängig zu sein. So konnten andere *c*-Typ Cytochrome in wesentlich höheren Ausbeuten heterolog in *E. coli* synthetisiert werden. Als Beispiele seien hier das Cytochrom *c*₅₅₀ aus *P. denitrificans* zu nennen, welches im Rahmen dieser Arbeit mit Ausbeuten von bis zu 15mg/Liter Kulturmedium hergestellt werden konnte. Cytochrom *c*₅₅₀ hat ein Molekulargewicht von 14 kDa und ist aufgrund seiner im Gegensatz zu SF weniger negativen Oberflächenladung ein „besseres Substrat“ für die heterologe Expression und Hämreifung in *E. coli*.

Desweiteren konnte ein lösliches Fragment des Cytochrom *c*₁ aus *Thermus thermophilus* im gleichen Expressionssystem mit Ausbeuten von bis zu 15 mg/Liter Medium exprimiert werden (Oliver Maneg, persönliche Mitteilung, 2002). Auch hier handelt es sich um ein Protein mit einer stärker ausgeglichenen Oberflächenladung und einem geringen Molekulargewicht von 8.8 kDa.

Auch das lösliche Fragment des Cytochrom *c*₅₅₂ aus *P. denitrificans* konnte in *E. coli* in Ausbeuten bis zu 10 mg/Liter Kulturmedium exprimiert werden (Reincke, 2000). Hierbei handelt es sich wiederum um ein kleineres (10.5 kDa), globuläres Protein.

Zusammenfassend ist es gelungen, zwei funktionelle lösliche Fragmente des Cytochrom *c*₁ aus *P. denitrificans* heterolog in *E. coli* zu exprimieren. Beide Proteine zeigten ein für Cytochrom *c*₁ charakteristisches Redox-Differenzspektrum.

5.1.1.3 Mutagenese

Da bislang noch keine Struktur eines prokaryotischen *bc*₁-Komplexes vorliegt, wurde in dieser Arbeit ausschließlich auf Strukturdaten der bereits kristallisierten mitochondrialen Komplexe (Iwata *et al.* 1998; Berry *et al.*, 1999; Hunte *et al.* 2000) zurückgegriffen, da die jeweiligen Untereinheiten der Proteinkomplexe eine relativ hohe Sequenz-Homologie zueinander aufweisen.

Eine Zielsetzung dieser Arbeit war es, die Interaktion zwischen löslichen Fragmenten des Cytochrom *c*₁ und Cytochrom *c*₅₅₂ aus *P. denitrificans* funktionell zu charakterisieren. Dies geschah vor dem Hintergrund der weitergehenden Frage, ob es sich hierbei um eine elektrostatische Wechselwirkung handelt. Dazu war es notwendig, exponierte, geladene einzelne Aminosäuren zu definieren und zu untersuchen, ob diese maßgeblich an der Wechselwirkung zwischen Cytochrom *c*₁ und Cytochrom *c*₅₅₂ beteiligt sind. Aus diesem Grund wurden gezielt saure Aminosäureseitenketten auf dem Cytochrom *c*₁ ausgewählt und mutiert. Die Beseitigung der negativen Ladungen erfolgte hierbei durch den Austausch von Glutamat oder Aspartat zu den jeweiligen Amidderivaten bzw. zu Lysin. In Falle von N278D wurde eine zusätzliche negative Ladung eingeführt.

Eine Kontrolle der erfolgreichen Klonierung und Einführung der gewünschten Punktmutationen, wurde durch Restriktionskartierung und DNA-Sequenzierung der erhaltenen Konstrukte ermöglicht. Es konnten zwölf der insgesamt 14 geplanten Punktmutationen erfolgreich hergestellt werden. Im Falle von E351Q und E352Q gelang es nicht, die gewünschte Mutation ohne *second-site* Mutationen einzubringen. Auch die Konstruktion eines neuen Primers führte zu keinem erfolgreichen Ergebnis. Aufgrund der Tatsache, dass die Konstrukte E351K und E352K zu diesem Zeitpunkt bereits vorlagen, wurde auf einen weiteren Versuch zur Herstellung von E351Q und E352Q verzichtet.

Trotz erfolgreicher Klonierung konnte die Mutante D349N nicht zur Expression gebracht werden. Die Gründe hierfür sind jedoch nicht in der Klonierungsstrategie zu suchen, da dieser Klon auf der DNA-Ebene einwandfrei war. D349N ließ sich auch unter der Variation sämtlicher in 4.1.7 beschriebenen Anzuchtbedingungen nicht zur Expression bringen. Da das Konstrukt D349K jedoch bereits aufgereinigt vorlag, wurde auf weitere Ansätze zur erfolgreichen Expression von D349N verzichtet.

5.1.2 Konstruktion und Expression des Cytochrom c_{550} aus *P. denitrificans*

Im drastischen Gegensatz zu der Expression der löslichen Konstrukte des Cytochrom c_1 , welche sich ohne die Zugabe von IPTG in *E. coli* nicht zur Expression bringen ließen, hatte die Induktion durch IPTG keinerlei Einfluss auf die Expression des löslichen Cytochrom c_{550} . Die starke Basalexpression des Proteins ließ sich auch durch eine IPTG-Zugabe zu unterschiedlichen Induktionszeitpunkten nicht steigern. Ein ähnlicher Effekt konnte bereits für die heterologe Expression des löslichen Cytochrom c_{552} beschrieben werden (Reincke, 1996; Reincke, 2000). Anders als beim Cytochrom c_{552} ließ sich die Ausbeute des Cytochrom c_{550} jedoch auch durch die Zugabe von IPTG zu späteren Induktionszeitpunkten (bis $OD_{546} = 2.5$) nicht steigern. Die Verwendung des pET Expressionssystems (Novagen) in Kombination mit den zusätzlichen Hämreifungsgenen des pEC 86 scheint im Falle des Cytochrom c_{550} eine Auswirkung auf die Expressionsbedingungen zu haben. Möglicherweise sind die *ccm*-Genprodukte nicht nur in der Lage, die Reifung des Cytochrom c_{550} zu beeinflussen, sondern ebenfalls dessen Expression zu regulieren.

5.1.3 Aufreinigung der löslichen Cytochrome [c_1 (KF/SF) und c_{550}]

Die Aufreinigung der löslichen Fragmente des Cytochrom c_1 aus *P. denitrificans* (KF und SF) erfolgte über Anionenaustauscher-Chromatographie und Gelfiltration. In der Regel lag das Protein nach der dritten Säule hinreichend sauber vor.

Die Aufreinigung des Kernfragments gestaltete sich wesentlich aufwendiger als die des sauren Fragments, da die saure Domäne des Cytochrom c_1 aus *P. denitrificans*, die eine Aufreinigung mittels Anionenaustauscher-Chromatographie stark vereinfacht, in KF deletiert wurde. Dennoch gelang die Aufreinigung des löslichen Fragments durch das in

4.1.8.1 beschriebene dreistufige Verfahren. Lediglich bei Proben, die für Untersuchungen zur Strukturermittlung (Kristallographie, NMR) herangezogen wurden, wurde dem Standardverfahren eine vierte Säule (Gelfiltration) hinzugefügt.

Ein allgemeines Problem bei der Aufreinigung von KF ergab sich aus dessen Instabilität. Wie mit DSC-Experimenten gezeigt werden konnte, begann sich das Kernfragment bereits bei Temperaturen um 40 °C spontan irreversibel zu entfalten. Dieser Prozess setzte auch bei niedrigeren Temperaturen, dann allerdings zeitverzögert, ein. So zeigte sich bei Ultrazentrifugations-Versuchen, dass das Kernfragment aus *P. denitrificans* bei einer Temperatur von 20 °C nicht über einen Zeitraum von mehr als 20 h stabil analysiert werden konnte. Bereits nach 6 h begann sich das Protein zu entfalten.

Sämtliche Schritte der Aufreinigung wurden standardmäßig bei 4 °C durchgeführt. Es zeigte sich jedoch in Einzelfällen, dass das Protein (KF) nach mehrtägiger Lagerung bei 4 °C auch bei dieser Temperatur einem Degradationsprozess unterlag. Aus diesem Grund wurden sämtliche Eluate unmittelbar nach der Aufreinigung bei -20 °C gelagert.

Die Aufreinigung des sauren Fragments war aufgrund der extremen Oberflächenladung des Proteins wesentlich unproblematischer, da dieses auch beim Waschen mit hochmolaren Salzpuffern (350 mM NaCl) noch an der Säule gebunden blieb. Ein spontaner Denaturierungsprozess wie beim Kernfragment konnte für SF nicht beobachtet werden.

Das lösliche Cytochrom *c*₅₅₀ aus *P. denitrificans* konnte bereits durch die Periplasma-Präparation weitestgehend aufgereinigt werden. Gründe, warum die Periplasma-Präparation bei Cytochrom *c*₅₅₀ erfolgreicher verlief als bei den löslichen Fragmenten des Cytochrom *c*₁, sind eventuell auf die native Löslichkeit des Cytochrom *c*₅₅₀ zurückzuführen. Im Gegensatz zu SF und KF handelt es sich beim Cytochrom *c*₅₅₀ um ein von Natur aus lösliches, periplasmatisch vorliegendes Protein.

5.2 Funktionelle Charakterisierung

5.2.1 *steady-state*-Kinetiken

Wie bereits in 4.2.1 beschrieben, führten die Versuche zur Entwicklung eines gekoppelten Tests zur Bestimmung einer *steady-state*-Kinetik der Reaktion von Cytochrom c_1 und Cytochrom c_{552} zu keinen reproduzierbaren Ergebnissen. Die Verwendung von Cytochrom- c -Oxidase (COX) barg praktische Probleme in sich. Es konnte eine unspezifische Wechselwirkung zwischen COX und Cytochrom c_1 beobachtet werden, was man aufgrund der negativen Oberflächenladung beider Proteine zunächst nicht erwartet hätte. Diese Wechselwirkung trat zudem völlig unabhängig von der Anwesenheit von Cytochrom c_{552} auf.

Versuche mit unterschiedlichen Cytochrom c_1 Präparationen führten zu den gleichen Ergebnissen. Auch zeigten beide Fragmente (SF und KF) eine vergleichbare Reaktion mit COX. Die Reproduzierbarkeit dieser Interaktion ließ hierbei Rückschlüsse auf eine direkte Wechselwirkung zwischen Cytochrom c_1 und Oxidase zu.

Zur Auswertung der Reaktionen dieses gekoppelten Testes mussten sämtliche Messungen nachträglich um diese unspezifische Wechselwirkung korrigiert werden.

Als sich herausstellte, dass die beobachtete Reaktion zudem nicht unabhängig von der Konzentration an eingesetzter COX war, musste die Konzentration des Hilfsenzymen soweit erhöht werden, bis diese keinen Einfluss mehr auf die Geschwindigkeit der Reaktion nahm. Das sich daraus ergebende Problem war eine signifikante Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit, die dazu führte, dass in diesem Konzentrationsbereich der Oxidase (~ 100 pmol aa_3 /Küvette) die Reaktion so schnell wurde, dass sie unter den gegebenen Bedingungen (konventionelles Spektrometer) nicht mehr vollständig detektiert werden konnte. Es war daher nicht möglich, *steady-state*-Kinetiken zwischen Cytochrom c_1 und Cytochrom c_{552} zu bestimmen.

5.2.2 *pre-steady-state*-Kinetiken

Sämtliche Untersuchungen zur Bestimmung der Ionenstärkeabhängigkeit der Reaktion zwischen Cytochrom c_1 und Cytochrom c_{552} sowie zur Charakterisierung der Mutanten des

Kernfragments, wurden mit Hilfe einer Stopped-Flow-Apparatur im *pre-steady-state*-Bereich durchgeführt.

Wie bereits in 4.2.2 und 4.2.3 beschrieben, konnte der Verlauf der Messkurven bei der Anpassung der Rohdaten wesentlich besser mit einer Biexponentialfunktion abgebildet werden. Aus diesem Grund wurden diese Daten für die Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen Cytochrom c_1 und Cytochrom c_{552} herangezogen.

Bimolekulare Reaktionen des Typs



lassen sich allgemein durch eine Kinetik zweiter Ordnung beschreiben. Liegt einer der beiden Reaktanden zu Beginn der Reaktion jedoch im vielfachen Überschuss vor ($[B] \gg [A]$), so kann man den Verlauf einer solchen bimolekularen Reaktion vereinfacht durch eine Reaktion erster Ordnung beschreiben. Man spricht dann von einer Reaktion *pseudo*-erster Ordnung. Dies bietet den Vorteil, dass die ermittelte Reaktionsgeschwindigkeit in direkten Bezug zu dem Produkt aus $[A]$ und der apparenten bimolekularen Austauschrate k_{on} gesetzt werden kann. Im Falle einer einfachen reversiblen oder irreversiblen bimolekularen Reaktion zeigt die Auftragung der ermittelten Geschwindigkeit (Werte für k_{obs}) gegen die jeweilige Konzentration des Reaktanden einen linearen Verlauf. Aus der Steigung dieser Geraden lässt sich die Geschwindigkeitskonstante k_{on} der Vorwärtsreaktion bestimmen. Eine solche Versuchsbedingung ($[B] \gg [A]$) bietet somit die Möglichkeit einer vereinfachten Auswertung der kinetischen Untersuchung einer bimolekularen Reaktion, da sich der Verlauf durch eine monoexponentielle Datenanpassung abbilden lässt.

Im Falle der Wechselwirkung zwischen Cytochrom c_1 und Cytochrom c_{552} musste aufgrund der spektralen Überlappung beider Proteine ein Messbereich im Soret gewählt werden (siehe 3.3.3). In diesem Spektralbereich zeigen beide Proteine eine sehr starke Absorption. Aus diesem Grund konnte die Konzentration keines der beiden Reaktanden wesentlich gegenüber der des anderen erhöht werden.

Für einen solchen Fall, wenn die Anfangskonzentrationen der beiden Reaktionspartner in vergleichbarer Größenordnung zueinander stehen, kann die oben beschriebene

Vereinfachung nicht zur Anwendung kommen, da die ermittelten Geschwindigkeiten (Werte für k_{obs}) nun konzentrationsabhängig von beiden Reaktanden sind.

Die folgende theoretische Simulation soll zeigen durch welche Funktion sich eine bimolekulare Reaktion des Typs $A + B \rightarrow C + D$, bei der die Anfangskonzentrationen von A und B variiert werden, am besten abbilden lässt. Hierzu wurden folgende Bedingungen vorausgesetzt:

- Die Geschwindigkeitskonstanten der Hin- und Rückreaktion wurden festgelegt ($k_{\text{hin}} = 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bzw. $k_{\text{rück}} = 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).
- Die Anfangskonzentrationen von C und D wurden festgelegt ($[C]^0 = 0$ bzw. $[D]^0 = 0$).

Die folgende Abbildung zeigt den Verlauf der Reaktion (Bildung von C) bei einer Anpassung der Daten nach einer Monoexponentialfunktion (links) und einer Biexponentialfunktion (rechts).

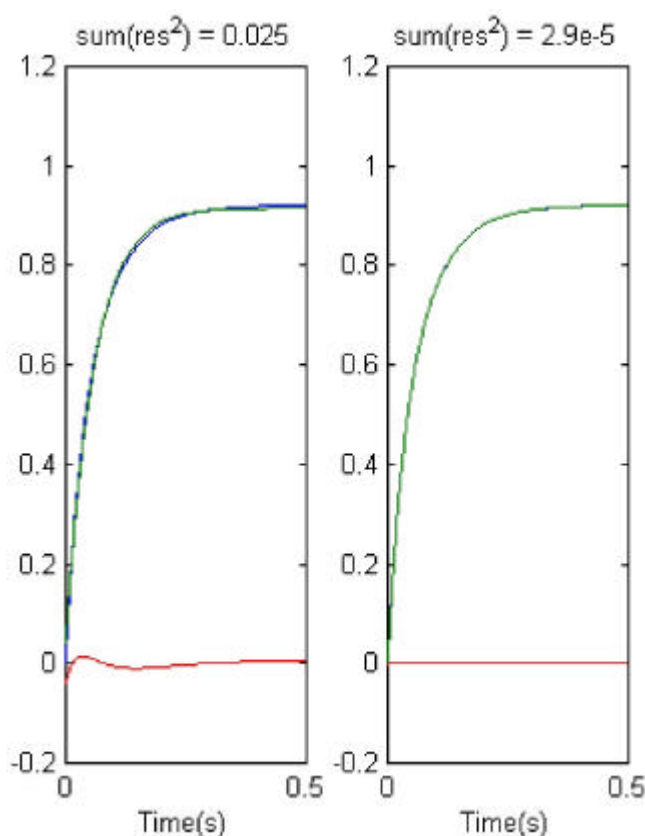


Abbildung 5.1: Verlauf der Bildung des Produktes C im Rahmen einer theoretischen Simulation der bimolekularen Reaktion $A + B \rightarrow C + D$. Die Anpassung der Rohdaten erfolgte hierbei nach einer monoexponentiellen Funktion (links) und einer biexponentiellen Funktion (rechts).

Der über jeder Abbildung genannte Wert gibt die Summe der kleinsten Fehlerquadrate von der Modellfunktion an. Je kleiner dieser Wert, desto besser die Anpassung der Daten. Im abgebildeten Fall wurden die Anfangskonzentrationen von A und B annähernd gleich gewählt ($[A] = 1 \mu\text{M}$, $[B] = 2 \mu\text{M}$). Unter diesen Bedingungen weicht das Verhalten der Reaktion ganz klar von der eingangs diskutierten Reaktion *pseudo*-erster Ordnung ab. Die monoexponentielle Anpassung führt zu einem unbefriedigenden Ergebnis, während eine Anpassung nach einer biexponentiellen Funktion eine wesentlich bessere Abbildung liefert.

Setzt man nun diese Simulation fort und variiert die Anfangskonzentration von B zu $20 \mu\text{M}$ bzw. $100 \mu\text{M}$ (bei einer konstanten Anfangskonzentration von A) zeigt sich, dass bereits bei 20fachem Überschuss von B gegenüber A eine monoexponentielle Datenanpassung zu einer weit befriedigenderen Anpassung der Daten führt (Daten nicht gezeigt). Bei 100fachem Überschuss an B liegen ganz klar die Bedingungen einer Reaktion *pseudo*-erster Ordnung vor. Die Reaktion lässt sich nun unter der Verwendung einer monoexponentiellen Funktion optimal anpassen.

In der folgenden Tabelle sind die Werte der durch die theoretische Simulation bestimmten Umsatzzahlen zur Bildung von C (k_{obs}) für die drei verschiedenen Anfangskonzentrationen von B unter der Verwendung der oben beschriebenen verschiedenen Gleichungssysteme zusammengefasst. Die für jede Bedingung beste Anpassung ist grau unterlegt.

	Art der Datenanpassung	a_{mono} a_1	k_{mono} k_1	a_2	k_2	Kleinstes Fehlerquadrat
B = 2 μM	Mono	0.869	17.28	-	-	0.2084
	Bi	0.214	50.82	0.710	14.61	0.1783
B = 20 μM	Mono	0.985	196.09	-	-	0.1801
	Bi	0.039	2590.00	0.973	193.62	0.1781
B = 100 μM	Mono	0.993	994.81	-	-	0.1793
	Bi	0.032	16690.00	0.985	986.16	0.1780

Tabelle 5.1: Zusammenfassung der durch die theoretische Simulation bestimmten Umsatzzahlen der Bildung von C unter der Verwendung der zwei oben beschriebenen Gleichungssysteme. B = Anfangskonzentration von B; Mono = Anpassung mit einer Monoexponentialfunktion; Bi = Anpassung mit einer Biexponentialfunktion; α_1 = Amplitude der schnellen Phase; α_2 = Amplitude der langsamen Phase; k_1 = Geschwindigkeit der schnellen Phase; k_2 = Geschwindigkeit der langsamen Phase. Für die monoexponentielle Datenanpassung gibt es nur einen Wert für k ($=k_{\text{mono}}$) und für α ($=\alpha_{\text{mono}}$). Die für jede Bedingung beste Anpassung wurde grau unterlegt.

Mit den Werten der theoretischen Simulation aus Tabelle 5.1 wird deutlich, dass im Falle einer biexponentiellen Datenanpassung die Geschwindigkeit der langsamen Phase (k_2) jeweils den Werten einer monoexponentiellen Datenanpassung (k_{mono}) gleichen, und dass mit steigender Konzentration von B (Reaktion *pseudo*-erster Ordnung) die Abweichungen zwischen k_{mono} und k_2 immer geringer werden.

Es konnte somit gezeigt werden, dass im Falle einer bimolekularen Reaktion, bei der beide Reaktionspartner in äquimolaren Konzentrationen zueinander vorliegen, eine monoexponentielle Datenanpassung zu keiner adäquaten Datenanpassung führt. Der Verlauf einer bimolekularen Reaktion ist unter diesen Bedingungen biphasisch. Die beste Datenanpassung wird durch die langsame Phase eines biexponentiellen Fits erreicht. Die Geschwindigkeit der Reaktion lässt sich somit durch k_2 am besten abbilden.

Im Falle der Untersuchungen des schnellen Elektronentransportes zwischen Cytochrom c_1 und Cytochrom c_{552} im *pre-steady-state*-Bereich lagen beide Reaktionspartner aus den

oben genannten Gründen in vergleichbaren Anfangskonzentrationen vor. Für einen solchen Fall wird für eine Reaktion zweiter Ordnung ein biphasischer Kurvenverlauf erwartet. Dieser konnte in allen Fällen der Reaktionen zwischen Cytochrom c_1 und Cytochrom c_{552} beobachtet werden.

Für die Auswertung der unter diesen Bedingungen bestimmten Umsatzzahlen liefert demnach die Anpassung nach einer Biexponentialfunktion die beste (empirische) Interpretation der gemessenen Daten. Die Geschwindigkeit des Elektronentransports zwischen Cytochrom c_1 und Cytochrom c_{552} lässt sich durch die Produktbildungsrate k_2 am besten abbilden. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit die in der Kinetik bestimmten Werte für k_2 (auch $k_{\text{obs}}^{\text{slow}}$) zur Auswertung herangezogen.

Die Biphasizität der gemessenen Kinetiken ist eine intrinsische Eigenschaft des untersuchten Elektronentransportsystems zwischen Cytochrom c_1 und Cytochrom c_{552} und liefert daher keine konkreten Anhaltspunkte für eine Konformationsänderung der Proteine.

Zusammenfassend kann man sagen, dass nach den Gesichtspunkten einer mathematischen Anpassung die Rohdaten durch die Verwendung einer Biexponentialfunktion wesentlich besser abgebildet werden. Dennoch führt die Anpassung einer Datenreihe nach einer monoexponentiellen Funktion zu Ergebnissen, die untereinander (innerhalb dieser Datenreihe) wesentlich besser korrelieren. Als Gründe hierfür sind eine sehr hohe Reaktionsgeschwindigkeit (Geschwindigkeitskonstanten zwischen $10^8 \cdot \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und $10^9 \cdot \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) und eine endliche Auflösungskapazität des Gerätes (Totzeit von ca. 5 ms bei jeder Messung) zu nennen. Bei den gegebenen hohen Reaktionsgeschwindigkeiten war es, vornehmlich im Bereich niedriger Ionenstärken, nicht möglich, einen vollständigen Reaktionsverlauf messtechnisch zu verfolgen. Bei sehr schnellen Reaktionen war der Elektronentransport bereits zu mehr als 90 % innerhalb der Totzeit der Apparatur abgeschlossen, so dass hier nur noch mit Hilfe mathematischer Auswertprogramme gegen die Anfangsgeschwindigkeit extrapoliert werden konnte.

Die Ergebnisse zur funktionellen Charakterisierung des schnellen Elektronentransports zwischen Cytochrom c_1 und Cytochrom c_{552} anhand von Messungen im *pre-steady-state*-Bereich seien hier noch einmal im einzelnen diskutiert:

5.2.2.1 Ionenstärkeabhängigkeit

Die Untersuchungen zur Ionenstärkeabhängigkeit zeigten, dass das saure Fragment unter den gegebenen Versuchsbedingungen im Vergleich zum Kernfragment (KF) keine erhöhte Spezifität gegenüber Cytochrom c_{552} besitzt. Bei der Betrachtung der Abbildungen 4.16 und 4.17 wird deutlich, dass die beiden Fragmente unter den gegebenen Versuchsbedingungen (3.5 °C, pH 8.0) eine miteinander vergleichbare Abhängigkeit von der Ionenstärke zeigen. Es konnte keine Rechtsverschiebung der Kurve für das saure Fragment beobachtet werden. Eine solche Verschiebung wäre zu erwarten gewesen, wenn die Reaktion zwischen löslichen Fragmenten des Cytochrom c_1 und Cytochrom c_{552} maßgeblich durch die saure Domäne des Cytochrom c_1 reguliert werden würde.

Die Untersuchungen mit Pferdeherz Cytochrom c und Cytochrom c_{550} (*P. denitrificans*) führten zu dem gleichen Ergebnis. Somit zeigen die beiden Fragmente des Cytochrom c_1 auch in ihrer Wechselwirkung mit anderen c -Typ-Cytochromen, die ebenfalls eine basische Interaktionsfläche besitzen, eine miteinander vergleichbare Abhängigkeit der Ionenstärke, unabhängig davon, ob es sich um einen homologen oder nicht-homologen Reaktionspartner handelt.

Die Tatsache, dass die oben erwähnte Annahme einer veränderten Ionenstärkeabhängigkeit des sauren Fragments gegenüber KF durch die Messungen nicht direkt bestätigt werden konnte, könnte darauf zurückzuführen sein, dass es sich bei den Messbedingungen nicht um die exakten physiologischen Bedingungen handelt. Das Cytochrom c_1 liegt unter nativen Bedingungen membranständig im bc_1 -Komplex vor, welcher bei *P. denitrificans* zudem mit den anderen Komplexen der Atmungskette in Form eines Superkomplexes assoziiert ist (Schägger, 2002). Das Herauslösen einer Untereinheit aus einem solchen Superkomplex kann durchaus einen Einfluss auf die Spezifität der isolierten Untereinheit gegenüber dem nativen Substrat haben.

Zudem kann die Deletion eines Membranankers zweier miteinander wechselwirkender membranständiger Proteine zu strukturellen Veränderungen führen, die sich auch auf die Physiologie des Elektronentransports auswirken kann. Durch einen Membrananker wird ein Protein innerhalb eines Komplexes fixiert und damit in die räumliche Nähe der physiologisch relevanten Reaktionspartner gebracht. Das Herauslösen zweier physiologischer Reaktionspartner aus einem Komplex führt zu einer vollen räumlichen Zugänglichkeit beider Proteine zueinander. Die Untersuchung des Elektronentransports

zwischen Cytochrom c_1 und Cytochrom c_{552} anhand von löslichen Fragmenten führt somit zu der Einführung weiterer Freiheitsgrade aus der Sicht der möglichen dreidimensionalen Assoziation beider Proteine zueinander.

All diese Faktoren können dafür sprechen, dass der erwartete Unterschied in der Ionenstärkeabhängigkeit zwischen den beiden Fragmenten KF und SF unter den gegebenen Bedingungen nicht nachweisbar ist.

Ob die saure Domäne des Cytochrom c_1 einen Einfluss auf die Ionenstärkeabhängigkeit des bc_1 -Komplex aus *P. denitrificans* hat, könnte durch Versuche mit einem entsprechend deletierten bc_1 -Komplex untersucht werden. Wie bereits in 4.1.6 beschrieben, konnte im Rahmen dieser Arbeit ein im *fbc*-Operon deletierter bc_1 -Komplex (Gerhus, 1992) erfolgreich homolog in *P. denitrificans* MK6 exprimiert werden. Mit dem vorliegenden Protein, in dem die saure Domäne des Cytochrom c_1 durch eine „in-frame“-Deletion innerhalb des *fbc*-Operons deletiert wurde, könnten vergleichende Untersuchungen zur Ionenstärkeabhängigkeit zwischen *P. denitrificans* Wildtyp bc_1 und dem deletierten *P. denitrificans* bc_1 -Komplex durchgeführt werden.

Aus den Untersuchungen zur Ionenstärkeabhängigkeit konnten im Rahmen dieser Arbeit jedoch noch weitere wichtige Informationen gewonnen werden. Wie in 4.2.3 beschrieben, konnten durch die Anwendung der Brønsted-Gleichung (Gleichung 4.3) Rückschlüsse auf die Anzahl der an der Wechselwirkung zwischen Cytochrom c_1 und Cytochrom c_{552} beteiligten Oberflächenladungen gezogen werden.

Für das Reaktionspaar KF-Cytochrom c_{552} wurde nach mono- und biexponentieller Datenanpassung ein Wert von 5 für das Produkt aus z_A und z_B bestimmt. Demnach sind, rein rechnerisch, 2-3 Ladungen auf jedem der beiden Cytochrome an der Wechselwirkung beteiligt. Für das saure Fragment lag der Wert für das Produkt aus z_A und z_B etwas niedriger (ein Wert von 4 für eine monoexponentielle, ein Wert von 2.5 für eine biexponentielle Datenanpassung). Daraus kann der Rückschluss gezogen werden, dass im direkten Vergleich eine geringere Anzahl von Resten an der Wechselwirkung zwischen SF und Cytochrom c_{552} als bei der Interaktion des Kernfragments mit seinem Elektronenakzeptor beteiligt sind. Dieser Sachverhalt könnte dadurch erklärt werden, dass die saure Domäne von SF aufgrund ihrer vollen räumlichen Zugänglichkeit im Hinblick auf das Substrat (Cytochrom c_{552}) in Konkurrenz zu der Substrat-Bindungsstelle des

Proteins tritt. Die gehäuften, exponierten Ladungen der sauren Domäne des SF mögen in einem membranfixierten Komplex als eine Art „Landebahn“ für die basische Interaktionsfläche des Cytochrom c_{552} fungieren und somit für eine erhöhte Spezifität des bc_1 -Komplexes Sorge tragen – unter den gegebenen Bedingungen der vollen räumlichen Zugänglichkeit hingegen, stehen sie eventuell mit der eigentlichen Bindungsstelle des Cytochrom c_{552} eher kontraproduktiv in Konkurrenz.

Es wurde ebenfalls die Ionenstärkeabhängigkeit der Reaktion zwischen Cytochrom c_1 und Cytochrom c_{550} untersucht. Hierbei konnte für das Reaktionspaar KF – Cytochrom c_{550} ein Wert von etwa 5 für das Produkt aus z_A und z_B bestimmt werden. Für SF lag der Wert für das Produkt aus z_A und z_B bei etwa 4.4. Somit zeigt sich hier ein ausgeglicheneres Bild zwischen den beiden Fragmenten. Die Interaktionsfläche des Cytochrom c_{550} ist weniger basisch als die des Cytochrom c_{552} . Aus diesem Grund könnte die oben beschriebene Konkurrenzreaktion zwischen saurer Domäne und eigentlicher Bindungsstelle in diesem Falle weniger drastisch ausfallen, was erklären würde, warum die Werte zwischen KF und SF hier nicht so stark divergieren.

Auch wenn es anhand der gewonnenen Daten nicht möglich war, die exakte Anzahl der beteiligten interagierenden Reste zu bestimmen, so ist es doch als absolut gesichert anzunehmen, dass die Interaktion der beiden untersuchten Elektronentransportpartner elektrostatischer Natur ist und dass die beiden beteiligten Proteine gegensätzliche Ladungen tragen, die an der Wechselwirkung maßgeblich beteiligt sind.

Dieser Sachverhalt wird zusätzlich durch die Ergebnisse, die mit der Negativkontrolle (Cytochrom c_{551} aus *Pseudomonas aeruginosa*) erzielt wurden, bestätigt. Das negativ geladene Cytochrom c_{551} zeigte unter den gegebenen Versuchsbedingungen nur eine schwach affine Wechselwirkung mit dem ebenfalls stark negativ geladenen Cytochrom c_1 aus *P. denitrificans*.

Wie bereits beschrieben, liefern die Werte für $k_{\text{obs}}^{\text{slow}}$ die beste Datenanpassung für die Reaktion zwischen Cytochrom c_1 und Cytochrom c_{552} . Aus diesem Grund wurde die Geschwindigkeitskonstante $k_{\text{on}}^{\text{slow}}$ zur Auswertung der gemessenen Daten herangezogen. Bei der Betrachtung der durch die Extrapolation gegen $I = 0$ gewonnenen Werte für die apparente Geschwindigkeitskonstante k_{on}^0 (siehe Tabelle 4.15) der Reaktion zwischen Cytochrom c_1 und Cytochrom c_{552} ergibt sich für KF ein gegenüber SF um den Faktor 6 erhöhter Wert für k_{on}^0 . Auch dieses Ergebnis lässt sich sehr gut mit der eben beschriebenen

Konkurrenzreaktion der negativ geladenen Reste auf der sauren Domäne des SF mit der eigentlichen Cytochrom c_{552} -Bindungsstelle im Zentrum des Proteins erklären.

Für die Reaktion zwischen Cytochrom c_1 und Cytochrom c_{550} ergibt sich ein sehr ähnliches Bild (siehe Tabelle 4.18). Die apparente Geschwindigkeitskonstante k_{on}^0 von KF ist hier jedoch nur um den Faktor 2.8 gegenüber dem Wert von SF erhöht. Somit ist auch hier der Unterschied zwischen Kernfragment und SF nicht mehr so drastisch wie bei der Wechselwirkung c_1 - c_{552} , was wiederum auf die ausgeglichene Oberflächenladung der Interaktionsfläche des Cytochrom c_{550} im Vergleich zu der des Cytochrom c_{552} zurückzuführen ist. Die erhaltenen Werte für die Reaktion mit Cytochrom c_1 liegen zudem um eine Größenordnung über denen der Wechselwirkung zwischen Cytochrom c_1 und Cytochrom c_{552} . Gründe hierfür könnten in der Datenanpassung zu suchen sein. Die Reaktion zwischen Cytochrom c_1 und Cytochrom c_{550} zeigt einen monophasischen Kurvenverlauf und wurde daher mit einer Monoexponentialfunktion angepasst. Der Vergleich einer solchen Anpassung mit einem Datensatz aus einer biexponentiellen Anpassung ist daher nicht unbedingt angebracht. Viel wichtiger erscheinen hier die Vergleiche der Werte k_{on}^0 von KF und SF innerhalb der Datenreihe.

Die errechneten Daten lassen jedoch eindeutig darauf schließen, dass es sich bei den untersuchten Elektronentransport-Reaktionen sowohl zwischen Cytochrom c_1 und Cytochrom c_{552} als auch zwischen Cytochrom c_1 und Cytochrom c_{550} jeweils um diffusionskontrollierte Prozesse handeln muss.

Zusammenfassend können aus diesen Ergebnissen zur Ionenstärkeabhängigkeit jedoch keine Informationen über mechanistische Zusammenhänge des untersuchten Elektronentransportes gewonnen werden, da die Ionenstärkeabhängigkeit eine thermodynamische Eigenschaft ist.

5.2.2.2 Spezifität von SF und KF gegenüber Cytochrom c_{552}

Beim Vergleich der beiden Cytochrom c_1 Fragmente (SF und KF) in ihrer Wechselwirkung mit Cytochrom c_{552} wird deutlich, dass beide Fragmente im Bereich mittlerer Ionenstärke ($I = 36 \text{ mM}$) gleich effiziente Elektronendonoren sind (siehe Tabelle 4.6). Das saure Fragment des Cytochrom c_1 aus *P. denitrificans* zeigte somit im Vergleich zu KF keine

erhöhte Spezifität gegenüber dem löslichen Fragment des Cytochrom c_{552} aus *P. denitrificans*. Dieses Ergebnis deckt sich mit den aus den Untersuchungen zur Ionenstärkeabhängigkeit erzielten Daten.

Die Ergebnisse zur Untersuchung der Reaktion zwischen Cytochrom c_1 und Pferdeherz Cytochrom c unterstreichen dies, denn auch hier zeigten beide Fragmente ein miteinander vergleichbares Elektronentransportverhalten. Die ermittelten Werte für k_{on} liegen hier jedoch etwa um den Faktor 2.5 über den Werten für das Reaktionspaar c_1 - c_{552} (siehe Tabelle 4.6).

Auch die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion von Cytochrom c_1 (KF und SF) und dem löslichen Cytochrom c_{550} aus *P. denitrificans* liegen über denen der Wechselwirkung c_1 - c_{552} und sind vergleichbar mit den Werten des Elektronentransports zwischen Cytochrom c_1 und Pferdeherz Cytochrom c (siehe Tabelle 4.7). Desweiteren zeigt das Kernfragment im Falle der Reaktion mit Cytochrom c_{550} eine im Vergleich zu SF um den Faktor 1.3 höhere Geschwindigkeitskonstante. Diese Differenz ist jedoch zu gering, um auf eine maßgeblich erhöhte Spezifität von KF gegenüber Cytochrom c_{550} hinzudeuten. Vielmehr scheinen sich beide Fragmente auch in diesem Versuch einander zu entsprechen.

Die Unterschiede der Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion des Cytochrom c_1 mit seinen unterschiedlichen (homologen wie heterologen) Substraten sind jedoch zu gering, um eine Aussage über eine organismenabhängige Spezifität des Cytochrom c_1 treffen zu können. Die beiden c_1 -Fragmente KF und SF zeigten mit den drei untersuchten Cytochromen (Pferdeherz Cytochrom c , sowie Cytochrom c_{552} und Cytochrom c_{550} aus *P. denitrificans*) sehr hohe Geschwindigkeitskonstanten ($k_{\text{on}}^{\text{slow}} \approx 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1} - 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Bei allen hier untersuchten Substraten handelt es sich um kleine lösliche Proteine, die eine basische Interaktionsdomäne auf ihrer Oberfläche aufweisen, so dass hier aufgrund der entgegengesetzten Oberflächenladungen mit einer Wechselwirkung zu rechnen war.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Cytochrom- c -Oxidase aus *P. denitrificans* mit artfremdem mitochondrialem Cytochrom c höhere bzw. vergleichbare Wechselzahlen zeigt, als mit den homologen Reaktionspartnern wie dem Cytochrom c_{550} (Smith *et al.*, 1976; Smith und Davies, 1991) oder dem Cytochrom c_{552} (Drosou *et al.*, 2002). Aus diesem Grund verwundert es nicht, dass die

löslichen Fragmente des Cytochrom c_1 mit dem mitochondrialen Cytochrom c höhere Geschwindigkeitskonstanten erreichen, als mit dem homologen Substrat Cytochrom c_{552} .

In Hinblick auf das lösliche Cytochrom c_{550} ist bekannt, dass dieses neben seiner Hauptaufgabe (Übertragung von Elektronen auf die NO_2^- , NO^- und N_2O -Reduktase) auch als alternativer Elektronenüberträger vom bc_1 -Komplex auf die aa_3 Oxidase fungieren kann (Harms und van Spanning, 1991; De Gier *et al.*, 1995; Otten *et al.*, 2001). Aus diesem Grund stehen die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten für die Reaktion zwischen Cytochrom c_1 und Cytochrom c_{550} nicht im Gegensatz zu den Erwartungen.

Zusammenfassend konnte auch im Bereich mittlerer Ionenstärke keine erhöhte Spezifität von SF zu Cytochrom c_{552} im Vergleich zu KF festgestellt werden. Es konnte auch keine erhöhte Spezifität von *P. denitrificans* Cytochrom c_1 gegenüber dem homologen Elektronenakzeptor Cytochrom c_{550} im Vergleich zu dem nicht homologen Reaktionspartner Pferdeherz Cytochrom c nachgewiesen werden.

Ein völlig anderes Bild ergibt sich bei der Betrachtung der Ergebnisse zur Wechselwirkung zwischen den löslichen Fragmenten des Cytochrom c_1 aus *P. denitrificans* mit dem löslichen Cytochrom c_{551} aus *Pseudomonas aeruginosa* (siehe Tabelle 4.8). Vergleicht man die erhaltenen Werte für k_{on} mit den Geschwindigkeitskonstanten der Reaktionen von SF und KF mit Cytochrom c_{552} , so ergibt sich für KF ein um den Faktor 10000 erniedrigter Wert für k_{on} und im Falle des sauren Fragments eine um den Faktor 2000 erniedrigte Geschwindigkeitskonstante. Diese Ergebnisse sprechen ganz deutlich für eine Spezifität des Cytochrom c_1 gegenüber seinen Substraten. Diese nachgewiesene Spezifität scheint sich innerhalb des vorliegenden Messsystems nicht auf die Gesichtspunkte der Homologie innerhalb eines Organismus zu beziehen, sondern vielmehr auf das elektrostatische Argument. Das kleine globuläre Cytochrom c_{551} besitzt eine stark negativ geladene Oberfläche und ist daher – unter elektrostatischen Gesichtspunkten – ein sehr schlechtes Substrat für das ebenfalls stark negativ geladene Cytochrom c_1 . Die Daten zeigen recht deutlich, dass sich die Reaktion zwischen Cytochrom c_{551} und Cytochrom c_1 sehr gut als eine Negativkontrolle für die Reaktion zwischen Cytochrom c_1 und Cytochrom c_{552} eignet.

Wie bereits bei der Diskussion der Ergebnisse zur Ionenstärkeabhängigkeit beschrieben, kann die Tatsache, dass keine direkte Spezifität der beiden Cytochrom c_1 Fragmente für homologe Partner gegenüber nicht-homologen Partnern nachgewiesen werden konnte, auch darauf zurückzuführen sein, dass es sich bei den Messbedingungen nicht um die exakten physiologischen Bedingungen handelt. Die löslichen Fragmente des Cytochrom c_1 sind nicht nur aus dem membranständigen bc_1 -Komplex herausgelöst, sondern unterliegen aufgrund der Deletion des Membranankers und der dadurch erlangten Löslichkeit einer vollen räumlichen Zugänglichkeit. Dieser neue Freiheitsgrad ermöglicht insbesondere der sauren Domäne von Cytochrom c_1 SF eine volle Beweglichkeit, die dazu führen kann, dass die saure Domäne in eine Konkurrenzsituation mit der Substrat-Bindungsstelle im Zentrum des Proteins um das wechselwirkende Cytochrom gerät.

5.2.3 Untersuchungen zur Bildung eines Komplexes aus Cyt c_1 und Cyt c_{552}

Im Rahmen der funktionellen Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen löslichen Fragmenten des Cytochrom c_1 und des Cytochrom c_{552} sollte untersucht werden, ob die beiden Proteine einen nachweisbaren Komplex miteinander eingehen. Hierzu wurden zwei Untersuchungen mit der analytischen Gelfiltration durchgeführt. Zum anderen wurde versucht, den Komplex mittels analytischer Ultrazentrifugation nachzuweisen. Beide Ansätze führten nicht zu dem nachhaltigen Beweis eines stabilen Komplexes zwischen Cytochrom c_1 (Kernfragment) und Cytochrom c_{552} .

Dieses Ergebnis schließt eine Wechselwirkung der beiden Proteinfragmente jedoch nicht aus. Die Versuche zur Etablierung eines kinetischen Messsystems der Elektronentransferreaktion zwischen Cytochrom c_1 und Cytochrom c_{552} im *steady-state*-Bereich zeigten auf, dass es sich bei dieser Reaktion um einen sehr schnellen Prozess handeln muss. Die Ergebnisse der *pre-steady-state*-Kinetiken unterstreichen dies sehr deutlich. Die bestimmten Werte für k_{obs} lagen hierbei im Bereich von bis zu mehreren 100 Elektronen pro Sekunde. Bei der Extrapolation der Daten gegen $I = 0$ erhielt man daraufhin apparente Geschwindigkeitskonstanten im Bereich von 10^8 bis zu $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Werte in dieser Größenordnung lassen eindeutig auf einen diffusionskontrollierten Prozess schließen.

Die Ergebnisse aus der analytischen Gelfiltration und Ultrazentrifugation verdeutlichen, dass es sich bei einem „Komplex“ aus den löslichen Fragmenten von Cytochrom c_1 und

Cytochrom c_{552} um einen Zustand sehr kurzer Lebensdauer handeln muss. Die beiden Proteine scheinen sich viel eher zufällig (diffusionskontrolliert) zu treffen, miteinander wechselzuwirken und sich dann wieder zu trennen. Die Proteine richten sich zwar aufgrund entgegengesetzter Oberflächenladungen der Interaktionsflächen zueinander aus, eine konformative Anpassung der beiden Proteine zueinander (Konformationsänderung zum „induced fit“) scheint in dem untersuchten System des Elektronentransports zwischen Cytochrom c_1 und Cytochrom c_{552} jedoch nicht zu erfolgen.

5.2.4 Untersuchungen zur Thermostabilität des Kernfragments

Wie in 4.2.6 beschrieben, zeigte das lösliche Kernfragment des Cytochrom c_1 aus *P. denitrificans* eine geringe Thermostabilität und wurde bereits durch Temperaturen über 40 °C irreversibel entfaltet. Es sind bis jetzt keine Untersuchungen zur Temperaturstabilität des Wildtyp Cytochrom c_1 aus *P. denitrificans* durchgeführt worden, so dass an dieser Stelle keine Aussage darüber gemacht werden kann, ob sich das verkürzte Proteinfragment (KF) vom Wildtyp bc_1 -Komplex unterscheidet. Im Vergleich zu anderen löslichen c -Typ Cytochromen zeigt das Kernfragment jedoch eine deutlich verminderte Temperaturstabilität. So führten thermische Denaturierungsstudien am voll reduzierten löslichen Fragment des Cytochrom c_{552} aus *P. denitrificans* zu einer wesentlich erhöhten Thermostabilität als beim voll reduzierten Cytochrom c_1 Kernfragment. Für das Cytochrom c_{552} beginnt die hitzebedingte Denaturierung erst bei 72 °C und ist bei 85 °C abgeschlossen. Zudem zeigt dieser Prozess des Schmelzvorgangs eine hohe Reversibilität (Reincke, 2000). Gründe für diesen drastischen Stabilitätsunterschied sind in der Natur des Kernfragments zu suchen. Es handelt sich hierbei zwar um die voll funktionelle Domäne des Cytochrom c_1 Genproduktes, die jedoch aus dem Komplex herausgelöst vorliegt. Wie bereits beschrieben, liegt das Cytochrom c_1 unter nativen Bedingungen membranständig im bc_1 -Komplex vor, welcher bei *P. denitrificans* zudem mit den anderen Komplexen der Atmungskette in Form eines Superkomplexes assoziiert ist (Schägger, 2002). Das Herauslösen einer Untereinheit aus dem Komplex kann durchaus einen Einfluss auf die Thermostabilität der isolierten Untereinheit haben und erklärt die Tatsache, dass das lösliche Kernfragment bereits bei 40 °C beginnt, sich irreversibel zu entfalten.

5.2.5 Kinetische Untersuchungen an Mutanten des Cytochrom c_1 Kernfragments

Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Mutanten des Cytochrom c_1 Kernfragments aus *P. denitrificans* wurden mittels Stopped-Flow-Untersuchungen hinsichtlich ihrer Fähigkeit zum schnellen Elektronentransport mit dem löslichen Cytochrom c_{552} aus *P. denitrificans* untersucht. Die Ergebnisse hierzu sind in Tabelle 4.19 zusammengefasst.

Die Werte machen deutlich, dass keine der eingeführten Punktmutationen zu einem vollständigen Aktivitätsverlust des Proteins führte. Vielmehr zeigten die meisten Mutanten eine im Vergleich zum Wildtyp nur leicht herabgesetzte Geschwindigkeitskonstante der Elektronentransport-Reaktion.

Der drastischste Effekt wurde für die Mutante E243K bestimmt (Reduktion der Geschwindigkeitskonstante auf 36 % der Wildtyp-Aktivität).

Die drei benachbarten Mutanten D349K, E351K und E352K zeigen eine leicht herabgesetzte Aktivität, die vergleichbar mit den Werten für D283K und E243Q ist. Die Mutante D380N hingegen zeigte Wildtyp-Aktivität.

Die beiden Derivate von E288, sowie D289K und D380K zeigen in ihrer Reaktion zu Cytochrom c_{552} eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Geschwindigkeitskonstante.

Die Ergebnisse zur Charakterisierung der Mutanten des Cytochrom c_1 Kernfragments durch pre-steady-state-Kinetiken sollen im folgenden diskutiert werden.

Eine Fragestellung dieser Arbeit war es, ob es sich bei der Elektronentransport-Reaktion zwischen Cytochrom c_1 und Cytochrom c_{552} um eine elektrostatische Wechselwirkung handelt, und ob negativ geladene exponierte Reste auf der Oberfläche des Cytochrom c_1 direkt an dieser Wechselwirkung beteiligt sind bzw., ob deren Mutation zum entsprechenden Amidderivat der Aminosäure (Neutralisation der Ladung an dieser Position) bzw. zu Lysin (Umkehr der Ladung an dieser Position) einen Einfluss auf die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion zwischen Cytochrom c_1 und Cytochrom c_{552} nimmt.

Die Arbeitsgruppe um Francis Millett konnte zeigen, dass die Reaktion zwischen *Rhodobacter sphaeroides* Cytochrom c_1 und Pferdeherz Cytochrom c durch die Mutation mehrerer exponierter saurer Reste auf der Oberfläche des Cytochrom c_1 signifikant beeinträchtigt wird (Tian *et al.*, 2000). Von den insgesamt 19 mutierten Positionen auf dem

Cytochrom c_1 zeigten acht Reste eine reduzierte Geschwindigkeitskonstante. Der drastischste Effekt konnte in *Rhodobacter* für die Positionen E101 und D102 bestimmt werden. Diese Reste sind hoch konserviert (siehe Abbildung 1.4) und entsprechen in *P. denitrificans* den Positionen E288 bzw. D289. Im Kernfragment wurden diese Reste zu Glutamin/Asparagin und Lysin mutiert (Janzon, 2001).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten kinetischen Untersuchungen an E288K, E288Q und D289K führten jedoch zu keiner reduzierten Geschwindigkeitskonstante dieser Konstrukte in ihrer Wechselwirkung mit Cytochrom c_{552} . Vielmehr zeigten diese drei Mutanten im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöhte Werte für die Geschwindigkeitskonstante k_{on} . Die beiden Derivate von Glutamat 288 waren in ihrer Reaktion mit Cytochrom c_{552} so schnell, dass ein Großteil der Reaktion bereits innerhalb der Totzeit des Gerätes abgelaufen war, so dass die Werte für k_{obs} zum Teil nur noch durch eine Extrapolation gegen $t = 0$ ermittelt werden konnten. Die Reaktion von E288Q und E288K zeigte zudem einen eindeutig monophasischen Kurvenverlauf (siehe Abbildung 4.27) und wurden aus diesem Grund einer monoexponentiellen Datenanpassung unterzogen. Der Vergleich dieser Geschwindigkeitskonstanten mit einem Datensatz aus einer biexponentiellen Anpassung ist nicht unbedingt angebracht und erlaubt keinen exakten Vergleich der gemessenen Daten untereinander.

Zusammenfassend führten die Mutationen an Position E288 jedoch keinesfalls (wie in *Rhodobacter* gezeigt werden konnte) zu einer verringerten Geschwindigkeitskonstante, sondern eher zu einer gegenüber dem Wildtyp erhöhten Geschwindigkeitskonstante der Reaktion mit Cytochrom c_{552} .

Auch die Mutante D289K zeigt, ebenso wie D380K, eine im Vergleich zum Wildtyp des Kernfragments stark erhöhte Geschwindigkeitskonstante der Reaktion mit Cytochrom c_{552} . Ein solches Verhalten ist schwer zu interpretieren. Es konnte jedoch eindeutig gezeigt werden, dass eine Mutation an den o.g. Positionen (E288, D289 und D380) zu keinem Aktivitätsverlust des Cytochrom c_1 Kernfragments führt.

Durch die Mutation N278D sollte im Gegensatz zu allen anderen im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Mutanten eine zusätzliche negative Ladung auf der

Oberfläche des Kernfragments eingeführt werden. Dieser Rest liegt in unmittelbarer Nachbarschaft eines hoch konservierten Glutamats. Es sollte untersucht werden, ob die Einführung eines weiteren sauren Restes zu einer Erhöhung der Geschwindigkeitskonstante der Reaktion zwischen Cytochrom c_1 und Cytochrom c_{552} führt oder nicht. Die Mutante N278D zeigte jedoch nur sehr unreproduzierbare Kinetiken, deren Verlauf z.T. triphasisch waren. Eine befriedigende Anpassung der Rohdaten war aus diesem Grund nicht möglich. Die Auswertung der schnellen Phase der Reaktion führte zu Geschwindigkeitskonstanten, die weit über denen des Wildtyp-Fragments liegen (siehe Tabelle 4.19, kursiv dargestellt). Von einer Interpretation der Daten wurde daraufhin abgesehen.

In der oben genannten Publikation (Tian *et al.*, 2000) konnten weiterhin signifikante Effekte für die Reste E162, E163 und E168 des Cytochrom c_1 aus *Rh. sphaeroides* bestimmt werden. Diese Reste entsprechen in *P. denitrificans* den Positionen G350, E351 und E355 (siehe Abbildung 1.4). E351 und E355 sind hierbei hoch konservierte saure Aminosäuren. In diesem Bereich befindet sich in *P. denitrificans* im Vergleich zu *Rhodobacter*, Hefe und Rind eine 3-Basen-Deletion. Zudem besitzt *P. denitrificans* zwei zusätzliche Glutamate (E352 und E354). Somit ergibt sich für das Cytochrom c_1 aus *P. denitrificans* an dieser Stelle (Position 349 bis 355) ein charakteristischer sog. „saurer patch“ (DGEEKKEE), der aus diesem Grund zu einem Ziel der Mutagenesestudien am Kernfragment ausgewählt wurde. Bei der Planung dieser Mutanten des Kernfragments wurden gezielt alle sauren Reste im Bereich der Aminosäuren 349 bis 355 ausgewählt und zu den jeweiligen Amidderivaten bzw. zu Lysin mutiert. Wie bereits beschrieben, zeigten die Derivate von Glutamat 354 und Glutamat 355 ein nach rechts verschobenes Redox-Differenzspektrum. Aus diesem Grund wurden nur drei Mutanten dieser Region kinetisch charakterisiert. Die drei benachbarten Mutanten D349K, E351K und E352K zeigten allesamt eine leicht herabgesetzte Aktivität, wobei E351K den stärksten Effekt (71 % der WT-Aktivität) zeigt. Diese Ergebnisse decken sich somit nicht mit den für *Rh. sphaeroides* bestimmten Geschwindigkeitskonstanten der entsprechenden Mutanten.

Dieser Sachverhalt lässt darauf schließen, dass die Wechselwirkung zwischen löslichen Fragmenten des Cytochrom c_1 und des Cytochrom c_{552} aus *P. denitrificans* nicht

maßgeblich durch einen einzelnen exponierten und sauren Rest im Bereich dieses „sauren patches“ auf dem Kernfragment reguliert wird. Die Geschwindigkeit des Elektronentransportes vom Cytochrom c_1 zum Cytochrom c_{552} könnte jedoch durch das Zusammenspiel größerer Ladungs-Cluster beeinflusst werden. So führt die Mutation eines Restes aus dieser Region in keinem Fall zu einer völligen Inaktivierung des Proteins.

Für die Reaktion zwischen Cytochrom c und dem bc_1 -Komplex aus Rinderherz wurden drei Interaktions-Regionen auf der Oberfläche des Cytochrom c_1 definiert (Gutweniger *et al.*, 1983; Stonehuerner *et al.*, 1985), die sich alle im Intramembranraum befinden. Die Regionen 1 und 3, die sich auf der entgegengesetzten Seite der Hämspalte befinden, scheinen die Diffusion des Cytochrom c zu steuern. Die direkte Umgebung der Hämspalte ist relativ hydrophob. Dies spricht dafür, dass die Interaktion der beiden c -Typ Cytochrome auf eine Domäne zurückgeht, die einen relativ hydrophoben Kern hat, der von einer komplementären elektrostatischen Peripherie umgeben ist (saure „patches“ auf dem Cytochrom c_1 , basische „patches“ auf dem Cytochrom c_{552}). Eine sehr ähnliche Anordnung findet man bei dem Komplex aus Hefe Cytochrom c und Cyt c Peroxidase (Pelletier und Kraut, 1992; Miller *et al.*, 1994; Ermann *et al.*, 1997).

In der folgenden Abbildung sind die für das mitochondriale Cytochrom c_1 beschriebenen Regionen anhand der Strukturdaten des Cytochrom c_1 aus Hefe dargestellt. Zudem sind anhand dieser Struktur die Positionen der im Rahmen dieser Arbeit charakterisierten, mutierten Reste hervorgehoben. Die Bezeichnung der Reste erfolgte hierbei nach der Nomenklatur von *P. denitrificans*.

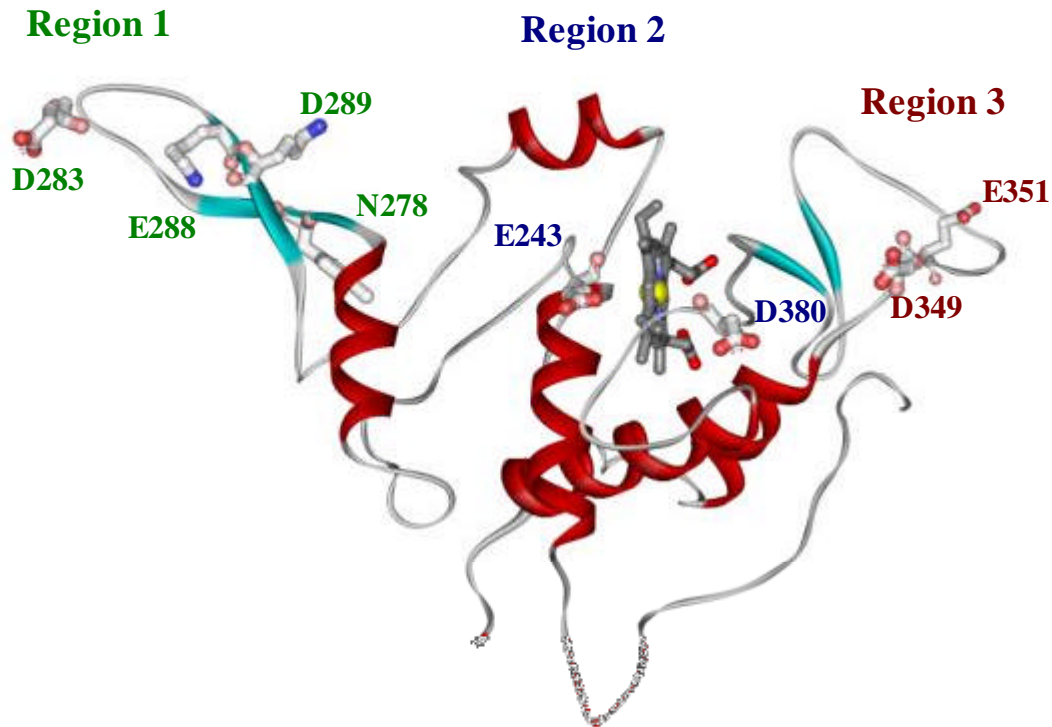


Abbildung 5.2: Grafische Darstellung des löslichen Fragments von *P. denitrificans* Cytochrom c_1 anhand der Strukturdaten aus Hefe (Hunte *et al.*, 2000). Es sind die drei für das mitochondriale Cytochrom c_1 beschriebenen Interaktionsregionen dargestellt. Zudem wurden die Positionen der im Rahmen dieser Arbeit charakterisierten Mutanten des Kernfragments des Cytochrom c_1 aus *P. denitrificans* hervorgehoben, und in der Farbe der jeweiligen Region markiert. (Region 1 = grün; Region 2 = blau; Region 3 = rot). Die Bezeichnung der Reste erfolgte hierbei nach der Nomenklatur von *P. denitrificans*.

Der o.g. „saure patch“ (DGEEKEE) aus *P. denitrificans* liegt in Region 3, die im bc_1 -Komplex aus Rind wiederum in direkter Assoziation mit dem „hinge“ Protein (Untereinheit 8) steht.

Zieht man anhand des Sequenzvergleichs zwischen *P. denitrificans* und anderen Organismen (siehe dazu Abbildung 1.4) Rückschlüsse auf eine Strukturhomologie der Cytochrome untereinander, so zeigt sich anhand von Abbildung 5.2, dass der Rest E351K (bei Hefe) relativ exponiert am Rand der Hämspalte positioniert ist. Eine solche Position spräche für eine direkte Interaktion mit positiv geladenen Resten auf der Oberfläche des Cytochrom c_{552} . Der Rest E351K könnte somit auch direkt einen Einfluss auf die Geschwindigkeit des Elektronentransportes nehmen. Die Mutation von Glutamat zu Lysin – was einer Ladungsumkehr entspricht – führt zu einer um 30 % verringerten Geschwindigkeitskonstante der Reaktion. Die Mutationen der benachbarten Reste (D349K

und E352K) führten zu weniger abgeschwächten Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion. Diese Effekte sprechen für eine multifaktoriell bedingte, aber von geladenen Aminosäureseitenketten abhängige Regulation der Elektronentransportreaktion des Kernfragments. Als Ausblick wäre die Herstellung von Doppel-Mutanten in diesem Bereich zu nennen.

Für *Rhodobacter* konnte gezeigt werden, dass ausschließlich Mutationen an sauren exponierten Resten aus Region 1 und 3 zu signifikanten Effekten (Reduktion der Geschwindigkeitskonstante) führten, während keiner der Reste aus Region 2 eine verminderte Elektronentransportrate zeigte. Die Autoren schlossen daraufhin Region 2 als Interaktionsfläche der Wechselwirkung zwischen *Rhodobacter* Cytochrom c_1 und Cytochrom c aus. Dieses Ergebnis widerspricht allerdings den cross-linking-Experimenten von Broger, Salardi und Azzi (Broger *et al.*, 1983).

Bei der Auswahl der zu mutierenden Reste auf dem Kernfragment des Cytochrom c_1 aus *P. denitrificans* wurde ebenfalls auf Reste in den anderen beiden Regionen (nicht nur innerhalb des „sauren patches“ der Region 3) auf der Oberfläche des Cytochroms zurückgegriffen.

So liegt Glutamat E243 aus *P. denitrificans* in Region 2. Der dazu in *Rh. spaeroides* analoge Rest (E56) zeigte bei der o.g. Mutagenesestudie nur einen geringen Effekt.

Vergleicht man die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse der beiden Mutanten von Glutamat 243 (aus *P. denitrificans*) miteinander, so wird deutlich, dass die Mutation von Glutamat zu Glutamin bereits zu einer leicht reduzierten (78 % vom WT) Geschwindigkeitskonstante des Elektronentransports zwischen KF und Cytochrom c_{552} führt. Durch die Mutation zu Lysin wird dieser Effekt noch weiter verstärkt (Reduktion auf 36 %). Dieses Ergebnis zeigt, dass die Aminosäure Glutamat 243 einen elektrostatischen Effekt auf die Interaktion zwischen Cytochrom c_1 Kernfragment und Cytochrom c_{552} aus *P. denitrificans* hat. Betrachtet man sich die Position dieses Restes anhand der Struktur von Hefe (siehe Abbildung 5.2) so fällt auf, dass Glutamat 243 zum Periplasma exponiert am oberen (dem Periplasma zugewandten) Rand der Hämspalte sitzt.

An dieser Position (E243) auf der Oberfläche des Cytochrom c_1 ist eine direkte Interaktion mit dem Cytochrom c_{552} während der Elektronentransport-Reaktion sehr gut möglich. Dieses Ergebnis ist ein Hinweis darauf, dass ein exponierte saure Reste auf der Oberfläche

des Cytochrom c_1 in diesem Bereich (Region 2) einen elektrostatischen Einfluss auf die Wechselwirkung mit der basischen Interaktionsfläche des Cytochrom c_{552} nehmen kann.

Die Versuche zur Ionenstärkeabhängigkeit der beiden Fragmente SF und KF in ihrer Wechselwirkung mit Cytochrom c_{552} konnten zeigen, dass die Reaktion dieser beiden Proteinfragmente elektrostatischer Natur ist. Zudem konnte gezeigt werden, dass geladene Aminosäureseitenketten auf der Oberfläche der beiden miteinander wechselwirkenden Proteine an der Interaktion der beiden Cytochrome beteiligt sind. Diese Annahme wird zudem durch die Ergebnisse der Versuche mit *P. denitrificans* Cytochrom c_1 und *Ps. aeruginosa* Cytochrom c_{551} gestützt.

Die im Rahmen dieser Arbeit bestimmten Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion zwischen Cytochrom c_1 und Cytochrom c_{552} lassen eindeutig auf einen diffusionskontrollierten Prozess schließen. Ein solches Verhalten schließt jedoch eine spezifische Oberflächen-Wechselwirkung der beiden Proteine nicht aus. In Bezug auf die Oberflächen-Ladungen konnte im Rahmen dieser Arbeit eine Spezifität des Cytochrom c_1 gegenüber seinen Substraten nachgewiesen werden. Beide Fragmente zeigten eine drastisch reduzierte Geschwindigkeitskonstante in ihrer Reaktion mit der Negativkontrolle Cytochrom c_{551} . Die Ergebnisse der Mutagenesestudie verdeutlichen jedoch, dass diese Substratspezifität sehr wahrscheinlich nicht hauptsächlich durch definierte gegensätzliche Ladungspaare auf der Oberfläche von Cytochrom c_1 und Cytochrom c_{552} definiert wird.

C. Lange und C. Hunte gelang kürzlich die Röntgenstrukturanalyse eines Co-Kristall des bc_1 -Komplexes der Hefe (QCR) mit seinem homologen Cytochrom c (CYC). Die Assoziation (Wechselwirkung) der beiden Proteine scheint in diesem Fall durch sehr kleine (kompakte) Interaktionsflächen und unter der Beteiligung weniger und ausschließlich hydrophober Aminosäureseitenketten bestimmt zu werden (Lange und Hunte, 2002). Ein solches Ergebnis steht in einem gewissen Gegensatz zu den im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnissen zur Elektronentransportreaktion zwischen Cytochrom c_1 und Cytochrom c_{552} aus *P. denitrificans*. Bei der Interpretation solcher aus einem Co-Kristall gewonnener Daten sollte man sich jedoch stets vor Augen führen, dass ein Kristall nur die Widerspiegelung eines Zustandsmoments darstellt und keinen aktiven Prozess zweier in Lösung miteinander wechselwirkenden Proteine abbildet.

6. Zusammenfassung

Der bc_1 -Komplex ist eine Komponente der Atmungskette und damit essentiell für den Energiestoffwechsel vieler Organismen, die zum aeroben Wachstum befähigt sind. Im Vergleich zu mitochondrialen bc_1 -Komplexen, die bis zu elf unterschiedliche Untereinheiten besitzen, ist das Enzym aus *Paracoccus denitrificans* mit nur drei Untereinheiten einfach aufgebaut. Vergleicht man die Sequenz des *P. denitrificans* Cytochrom c_1 Genproduktes mit denen anderer prokaryotischer und mitochondrialer Cytochrom c_1 Untereinheiten, so fällt auf, dass dieses prokaryotische Protein eine für *Paracoccus* charakteristische zusätzliche N-terminale Domäne von ca. 150 Aminosäuren trägt, die zudem eine sehr auffällige Zusammensetzung besitzt (40% saure Reste, 40% Alanine, keine einzige positiv geladene Aminosäure). Diese saure Domäne wird in anderen Organismen durch zusätzliche Untereinheiten innerhalb des bc_1 -Komplexes dargestellt, die in direkter Assoziation mit dem Cytochrom c_1 vorliegen. Bis dato konnte für *Paracoccus* jedoch noch kein eindeutiger Beweis für eine Beteiligung dieser sauren Domäne an der Wechselwirkung zwischen bc_1 und den Substraten des Komplexes geführt werden.

Ziel dieser Arbeit war es zunächst, zwei lösliche Fragmente des Cytochrom c_1 aus *P. denitrificans* zu konstruieren und in *E. coli* heterolog zu exprimieren. Durch zielgerichtete Mutagenese am Cytochrom c_1 und anschließende kinetische Charakterisierung der Produkte sollte die funktionelle Bedeutung einzelner Aminosäurereste dargestellt werden.

Es ist im Rahmen dieser Arbeit gelungen, zwei lösliche Fragmente des Cytochrom c_1 aus *P. denitrificans* zu exprimieren. Für das saure Fragment (SF) wurde lediglich der Membrananker deletiert, während das Kernfragment (KF) durch die zusätzliche Deletion der sauren Domäne als eine Art minimalisiertes Cytochrom c_1 anzusehen ist. Beide Fragmente konnten nach erfolgreicher Aufreinigung durch pre-steady-state-Kinetiken in ihrer Wechselwirkung mit dem homologen Reaktionspartner Cytochrom c_{552} sowie mit drei weiteren c -Typ Cytochromen funktionell charakterisiert werden. Des weiteren wurden zahlreiche Mutanten von KF hergestellt und ebenfalls hinsichtlich ihrer Wechselwirkung mit Cytochrom c_{552} getestet.

Die Untersuchungen zur Ionenstärkeabhängigkeit des Cytochrom c_1 zeigten, dass das saure Fragment unter den gewählten Versuchsbedingungen im Vergleich zu KF keine erhöhte Spezifität gegenüber Cytochrom c_{552} besitzt. Es konnte jedoch eindeutig gezeigt werden, dass die Interaktion der beiden untersuchten Elektronentransportpartner von der Wechselwirkung geladener Aminosäureseitenketten auf beiden Proteinen abhängt und somit elektrostatischer Natur ist. Dieser Sachverhalt wird zusätzlich durch die Ergebnisse bestätigt, die mit der Negativkontrolle (Cytochrom c_{551} aus *Ps. aeruginosa*) erzielt wurden. Dieses negativ geladene Protein zeigte nur eine schwach affine Wechselwirkung mit dem ebenfalls stark negativ geladenen Cytochrom c_1 aus *P. denitrificans*.

Zusätzliche kinetische Untersuchungen mit weiteren Cytochromen im Bereich mittlerer Ionenstärke zeigten, dass die beiden löslichen Fragmente SF und KF keine erhöhte Spezifität gegenüber homologen Elektronenakzeptoren (Cyt c_{552} und Cyt c_{550} aus *P. denitrificans*) im Vergleich zu dem nicht-homologen Reaktionspartner (Pferdeherz Cyt c) besitzen. Bei diesen drei Cytochromen handelt es sich um Proteine, die eine basische Interaktionsfläche aufweisen. In Hinblick auf die Ergebnisse zur Wechselwirkung von KF und SF mit dem löslichen Cytochrom c_{551} aus *Ps. aeruginosa* wird jedoch deutlich, dass die Spezifität des Cytochrom c_1 gegenüber möglicher Substrate alleinig durch das Kriterium des Oberflächenpotentials bedingt ist.

Keine der eingeführten Punktmutationen führte zu einem vollständigen Aktivitätsverlust des Proteins. Vielmehr zeigten die meisten Mutanten eine im Vergleich zum Wildtyp leicht herabgesetzte Geschwindigkeitskonstante der Elektronentransport-Reaktion. Der deutlichste Effekt wurde für die Mutanten E243K (36 % der WT-Aktivität) und E243Q (78 % der WT-Aktivität) bestimmt. Dieser Rest ist am oberen, dem Periplasma zugewandten Rand der Hämspalte positioniert, wodurch eine direkte Interaktion mit dem Cytochrom c_{552} während der Elektronentransport-Reaktion sehr gut möglich ist.

Die im Rahmen dieser Arbeit bestimmten Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion zwischen Cytochrom c_1 und Cytochrom c_{552} lassen eindeutig auf einen diffusionskontrollierten Prozess schließen. Ein solches Verhalten schließt eine spezifische Oberflächen-Wechselwirkung der beiden Proteine nicht aus. Die Ergebnisse der Mutagenesestudie verdeutlichen jedoch, dass die Substratspezifität nicht primär durch definierte gegensätzliche Ladungspaare auf der Oberfläche von Cytochrom c_1 und Cytochrom c_{552} definiert wird.

7. Literaturverzeichnis

Ambler R. P., Meyer T. E., Kamen M. D., Schichman S. A. und Sawyer L. (1981) A reassessment of the structure of *Paracoccus* cytochrome *c*₅₅₀. *J. Mol. Biol.* **147**, 351-356

Anthony C. (1988) Quinoproteins and energy transduction. Bacterial Energy Transduction. *Academic Press.*, 293-316

Arslan E., Schulz H., Zufferey R., Kunzler P. und Thöny-Meyer L. (1998) Overproduction of the *Bradyrhizobium japonicum* *c*-type cytochrome subunits of the *cbb*₃ oxidase in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **251**, 744-747

Baker S. C., Ferguson S. J., Ludwig B., Page M. D., Richter O. M. und van Spanning R. J. (1998) Molecular genetics of the genus *Paracoccus*: metabolically versatile bacteria with bioenergetic flexibility. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 1046-78

Berry E. A. und Trumpower B. L. (1985) Isolation of ubiquinol oxidase from *Paracoccus denitrificans* and resolution into cytochrome *bc*₁ and cytochrome *c-aa*₃ complexes. *J. Biol. Chem.* **260**, 2458-2467

Berry E. A., Huang L. S., Zhang Z. und Kim S. H. (1999) Structure of the avian mitochondrial cytochrome *bc*₁ complex. *J Bioenerg Biomembr.* **31**, 177-90

Bosma G., Braster M., Stouthamer A. H. und van Verseveld H. W. (1987) Isolation and characterization of ubiquinol oxidase complexes from *Paracoccus denitrificans* cells cultured under various limiting conditions in the chemostat. *Eur. J. Biochem.* **165**, 657-663

Broger C., Salardi S. und Azzi A. (1983) Interaction between isolated cytochrome c_1 and cytochrome c . *Eur. J. Biochem.* **131**, 349-52

Brønsted J. N. und La Mer, V. K. (1924) The activity coefficients of ions in very dilute solutions. *J. Am. Chem. Soc.* **46**, 555-573

Chance B. (1957) Techniques for the assay of the respiratory enzymes. *Methods Enzymol.* **4**, 273-329

Cutruzzola F., Ciabatti I., Rolli G., Falcinelli S., Arese M., Ranghino G., Anselmino A., Zennaro E. und Silvestrini M. C. (1997) Expression and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* cytochrome c_{551} and two site-directed mutants: role of tryptophan 56 in the modulation of redox properties. *Biochem. J.* **15**, 35-42

Darnell J., Lodish H. und Baltimore D. (1994) Molekulare Zellbiologie. *Walter de Gruyter Verlag*, 673-676

de Gier J. W. L., Lübben N., Reijnders W. N. M., Tipker C. A., Slotboom D. J., van Spanning R. J. M., Stouthamer A. H. und van der Oost J. (1994) The terminal oxidases of *Paracoccus denitrificans*. *Mol. Microbiol.* **13**, 183-196

de Gier J. W., van der Oost J., Harms N., Stouthamer A. H. und van Spanning R. J. (1995) The oxidation of methylamine in *Paracoccus denitrificans*. *Eur J Biochem* **229**, 148-54

Dennis J. J. und Zylstra G. J. (1998) Improved antibiotic-resistance cassettes through restriction site elimination using *Pfu* DNA polymerase PCR. *Biotechniques* **25**, 772

- Drosou V.**, Reincke B., Schneider M. und Ludwig B. (2002) Specificity of the interaction between the *Paracoccus denitrificans* oxidase and its substrate cytochrome *c*: comparing the mitochondrial to the homologous bacterial cytochrome *c*₅₅₂, and its truncated and site-directed mutants. *Biochemistry* **41**, 10629-34
- Erman J. E.**, Kresheck G. C., Vitello L. B. und Miller M. A. (1997) Cytochrome *c*/cytochrome *c* peroxidase complex: effect of binding-site mutations on the thermodynamics of complex formation. *Biochemistry* **36**, 4054-60
- Gerhus E.**, Steinrücke P. und Ludwig, B. (1990) *Paracoccus denitrificans* cytochrome *c*₁ gene replacement mutants. *J. Bacteriol.* **172**, 2392-2400
- Haddock B. A.** und Jones C. W. (1977) Bacterial respiration. *Bacteriol. Rev.* **41**, 47-99
- Haltia T.**, Puustinen A. und Finel M. (1988) The *Paracoccus denitrificans* cytochrome *aa*₃ has a third subunit. *Eur. J. Biochem.* **172**, 543-546
- Hanahan D.** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557
- Harms N.** und van Spanning, R. J. M. (1991) C1 metabolism in *Paracoccus denitrificans*. Genetics of *Paracoccus denitrificans*. *J. Bioenerg. Biomembr.* **23**, 187-210
- Harrenga A.**, Reincke B., Rüterjans H., Ludwig B. und Michel H. (2000) Structure of the soluble domain of cytochrome *c*₅₅₂ from *Paracoccus denitrificans* in the oxidized and reduced states. *J. Mol. Biol.* **295**, 667-678

- Holland** V. R., Saunders B. C. Rose F. L. und Walpole A. L. (1974) A Safer Substitute for Benzidine in the Detection of Blood. *Tetrahedron*, **30**, 3299-3302.
- Hunte** C., Koepke J., Lange C., Roßmanith T. und Michel H. (2000) Structure at 2.3 Å resolution of the cytochrome *bc*₁ complex from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* co-crystallized with an antibody Fv fragment. *Structure* **8**, 669-684
- Iwata** S., Lee J. W., Okada K., Kyongwon L., Iwata M., Rasmussen B., Link T. A., Ramaswamy S. und Jap B. K. (1998) Complete Structure of the 11-Subunit Bovine Mitochondrial Cytochrome *bc*₁ Complex. *Science* **281**, 64-71
- John** P. und Whatley F. R. (1975) *Paracoccus denitrificans* and the evolutionary origin of the mitochondrion. *Nature* **254**, 495-498
- Kim** C. H. und King T. E. (1983) A mitochondrial protein essential for the formation of the cytochrome *c*₁-*c* complex. Isolation, purification, and properties. *J Biol Chem* **258**, 13543-51
- Kim** C. H., Balny C. und King T. E. (1987) Role of the hinge protein in the electron transfer between cardiac cytochrome *c*₁ and *c*. Equilibrium constants and kinetic probes. *J Biol Chem* **262**, 8103-8
- Kim** C. H. und Zitomer R. S. (1990) Disruption of the gene encoding subunit VI of yeast cytochrome *bc*₁ complex causes respiratory deficiency of cells with reduced cytochrome *c* levels. *FEBS Lett.* **266**, 78-82
- Kurowski** B. und Ludwig B. (1987) The genes of the *Paracoccus denitrificans* *bc*₁ complex. Nucleotide sequences and homologies between bacterial and mitochondrial subunits. *J. Biol. Chem.* **262**, 13805-13811

Lange C. und **Hunte C.** (2002) Crystal structure of the yeast cytochrome *bc*₁ complex with its bound substrate cytochrome *c*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 2800-5

Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685

Ludwig B. (1992) Terminal oxidases in *Paracoccus denitrificans*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1101**, 195-197

Ludwig B. und **Schatz G.** (1980) A two-subunit cytochrome *c* oxidase (cytochrome *aa*₃) from *Paracoccus denitrificans*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **77**, 196-200

Lücke C., **Reincke B.**, **Löhr F.**, **Pristovšek P.**, **Ludwig B.** und **Rüterjans, H.** (2000) Letter to the Editor: Complete ¹H, ¹⁵N and ¹³C assignment of the functional domain of *Paracoccus denitrificans* cytochrome *c*₅₅₂ in the oxidized state. *J. Biomol. NMR* **18**, 365-366

Mc Lachlan A. D., **Staden R.** und **Boswell D. R.** (1984) A method for measuring the non-random bias of a codon usage table. *Nucleic Acids Res.* **12**, 9567-75

Mc Pherson D. T. (1988) Codon preference reflects mistranslational constraints: a proposal. *Nucleic Acids Res.* **16**, 4111-20

Miller M. A., **Liu R.Q.**, **Hahn S.**, **Geren L.**, **Hibdon S.**, **Kraut J.**, **Durham B.** und **Millett F.** (1994) Interaction domain for the reaction of cytochrome *c* with the radical and the oxyferryl heme in cytochrome *c* peroxidase compound I. *Biochemistry* **29**, 8686-93

Mitchell P. (1961) Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic Type of Mechanism. *Nature* **191**, 144-148

Moir J. W. B. und Ferguson S. J. (1994) Properties of a *Paracoccus denitrificans* mutant deleted in cytochrome *c*₅₅₀ indicate that a copper protein can substitute for this cytochrome in electron transport to nitrite, nitric oxide and nitrous oxide. *Microbiology* **140**, 389-397

Morgan J. E., Verkhovsky M. I. und Wikström M. (1994) The histidine cycle: a new model for proton translocation in the respiratory heme-copper oxidases. *J. Bioenerg. Biomembr.* **26**, 599-608

Nokhal T. H. und Schlegel H. G. (1983) Taxonomic study of *Paracoccus denitrificans*. *Int. J. Syst. Bacterial.* **175**, 4400-4404

Ohta S, Goto K, Arai H. und Kagawa Y. (1987) An extremely acidic amino-terminal presequence of the precursor for the human mitochondrial hinge protein. *FEBS Lett* **226**, 171-5

Otten M F., van der Oost J., Reijnders W. N., Westerhoff H.V., Ludwig B. und van Spanning R.J. (2001) Cytochromes *c*₅₅₀ , *c*₅₅₂ and *c*₁ in the electron transport network of *Paracoccus denitrificans*: redundant or subtly different in function? *J. Bacteriol.* **183**, 7017-26

Pelletier H. und Kraut J. (1992) Crystal structure of a complex between electron transfer partners, cytochrome *c* peroxidase and cytochrome *c*. *Science* **258**, 1748-55

Prebble J. N. (1996) Successful Theory Development in Biology: A Consideration of the Theories of Oxidative Phosphorylation Proposed by Davies and Krebs, Williams and Mitchell. *Bioscience Reports* **16**, 207-215

Pristovšek P., Lücke C., Reincke B., Löhr F., Ludwig B. und Rüterjans H. (2000a) Letter to the Editor: Complete ^1H , ^{15}N and ^{13}C assignment of the functional domain of *Paracoccus denitrificans* cytochrome c_{552} in the reduced state. *J. Biomol. NMR* **16**, 353-354

Pristovšek P., Lücke C., Reincke B., Ludwig B. und Rüterjans H. (2000b) Solution structure of the functional domain of *Paracoccus denitrificans* cytochrome c_{552} in the reduced state. *Eur. J. Biochem.* **267**, 4205-4212

Reincke B. (1996) Optimierung der Expression und Reinigung eines löslichen Fragments des Cytochrom c_{552} aus *Paracoccus denitrificans*. Diplomarbeit, Frankfurt am Main.

Reincke B. (2000) Strukturelle und funktionelle Untersuchungen löslicher Fragmente des Cytochrom c_{552} aus *Paracoccus denitrificans*. Dissertation, Frankfurt am Main.

Reincke B., Thöny-Meyer L., Dannehl C., Odenwald A., Aidim M., Witt H., Rüterjans H. und Ludwig B. (1999) Heterologous expression of soluble fragments of cytochrome c_{552} acting as electron donor to the *Paracoccus denitrificans* cytochrome c oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* **1441**, 114-120

Richter O.- M., Tao J. S., Turba A. und Ludwig B. (1994) A cytochrome ba_3 functions as a quinol oxidase in *Paracoccus denitrificans*. Purification, cloning, and sequence comparison. *J. Biol. Chem.* **269**, 23079-23086

Sanger F., Nicklen S. und Coulson R. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**, 5463-5468

Schägger H. und von Jagow G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1-100kDa. *Anal. Biochem.* **166**, 368-379

Schägger H. (2002) Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **1555**, 154-9

Smith L., Davies H. C. und Nava M. E. (1976) Evidence for Binding Sites on Cytochrome *c* for Oxidases and Reductases from Studies of Different Cytochromes *c* of known structure. *Biochemistry* **15**, 5827-5831

Smith L. und Davies H. C. (1991) The reactions of the oxidases and reductases of *Paracoccus denitrificans* with cytochromes *c*. *J. Bioenerg. Biomembr.* **23**, 303-319

Steinrücke P. und Ludwig B. (1993) Genetics of *Paracoccus denitrificans*. *FEMS Microbiol Rev* **10**, 83-117

Stonehuerner J., O' Brien P., Geren L., Millett F., Steidl J., Yu L. und Yu C. A. (1985) Identification of the binding site on cytochrome *c*₁ for cytochrome *c*. *J. Biol. Chem.* **260**, 5392-8

Stouthamer A. H. (1980) Bioenergetic studies on *Paracoccus denitrificans*. *Trends Biochem. Sci.* **5**, 164-166

Stouthamer A. H. (1991) Metabolic regulation including anaerobic metabolism in *Paracoccus denitrificans*. *J. Bioenerg. Biomembr.* **23**, 163-185

Thomas P. E.; Ryan D. und Levin W. (1976) An Improved Staining Procedure for the Detection of the Peroxidase Activity of Cytochrome P-450 on Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gels. *Analytical Biochemistry* **75**, 168-176

Tian H., Sadoski R., Zhang L., Yu C. A., Yu L., Durham B. und Millett F. (2000) Definition of the Interaction Domain for Cytochrome *c* on the Cytochrome *bc*₁ Complex. *J. Biol. Chem.* **251**, 2197-2206

Timkovich R.; Dickerson R. E. und Margoliash E. (1976a) Amino acid sequence of *Paracoccus denitrificans* cytochrome *c*₅₅₀. *J. Biol. Chem.* **251**, 2197-2206

Timkovich R.; Dickerson R. E.; Margoliash E. (1976b). The structure of *Paracoccus denitrificans* cytochrome *c*₅₅₀. *J. Biol. Chem.* **251**, 4033-4046

Trumpower B. L. und Gennis R. B. (1994) Energy transduction by cytochrome complexes in mitochondrial and bacterial respiration: the enzymology of coupling electron transfer reactions to transmembrane proton translocation. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 675-716

Turba A. (1993) Molekularbiologische und biochemische Charakterisierung des Membran-gebundenen Cytochrom *c*₅₅₂ aus *Paracoccus denitrificans*. Dissertation, Frankfurt am Main.

van Spanning R. J. M., Wansell C., Harms N., Oltmann L. F. und Stouthamer A. H. (1990) Mutagenesis of the Gene Encoding Cytochrome *c*₅₅₀ of *Paracoccus denitrificans* and Analysis of the Resultant Physiological Effects. *Journal of Bacteriology* **172**, 986-996

van Spanning R. J. M., Wansell C. W., Reijnders W. N. M., Harms N., Ras J., Oltmann L. F. und Stouthamer A. H. (1991) A method for introduction of unmarked mutations in the genome of *Paracoccus denitrificans*: construction of strains with multiple mutations in the genes encoding periplasmic cytochromes *c*₅₅₀, *c*_{551i}, and *c*_{553i}. *J. Bacteriol.* **173**, 6962-70

van Spanning R. J. M., de Boer A. P. N., Reijnders W. N. M., de Gier J. W. L., Delorme C. O., Stouthamer A. H., Westerhoff H. V., Harms N. und van der Oost J. (1995) Regulation of oxidative phosphorylation: the flexible respiratory network of *Paracoccus denitrificans*. *J. Bioenerg. Biomem.* **27**, 499-512

van Verseveld H. W., Braster M., Boogert F. C., Chance B. und Stouthamer A. H. (1983) Energetic aspects of growth of *Paracoccus denitrificans*: oxygen limitation and shift from anaerobic nitrate-limitation to aerobic succinate-limitation. Evidence for a new alternative oxidase, cytochrome *a*₁. *Arch. Microbiol.* **135**, 229-236

von Jagow G. und Engel W. D. (1980) Structure and Function of the Energy-Converting System of Mitochondria. *Angew. Chem.* **19**, 253-271

Witholt B., Boekhout M., Kingma J., van Heerikhuizen H. und de Leij L. (1976) An efficient and reproducible procedure for the formation of spheroplasts from variously grown *Escherichia coli*. *Anal. Biochem.* **74**, 160-170

Witt H., Zickermann V. und Ludwig B. (1995) Site-directed mutagenesis of cytochrome-*c*-oxidase reveals two acidic residues involved in the binding of cytochrome *c*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1230**, 74-76

Witt H., Malatesta F., Nicoletti F., Brunori M. und Ludwig B. (1998) Cytochrome-*c*-binding site on cytochrome oxidase in *Paracoccus denitrificans*. *Eur. J. Biochem.* **251**, 367-373

Woese, C. R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**, 221-271

8. Abkürzungsverzeichnis

AAP	Protein A-Alkalische Phosphatase Konjugat
Amp	Ampicillin
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BSA	Albumin aus Rinderserum (<u>B</u> ovine <u>S</u> erum <u>A</u> lbumine)
Cm	Chloramphenicol
COX	Cytochrom- <i>c</i> -Oxidase
Cyt	Cytochrom
DEAE	Diethylaminoethyl
DSC	<u>D</u> igital <u>S</u> canning <u>C</u> alorimetry
DSK	<u>D</u> oppel <u>S</u> ektor <u>K</u> üvette
DSS	Disability Status Scale
ϵ	Extinktionskoeffizient
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ET	Elektronentransfer
EtOH	Ethanol
g	Gravitationskonstante (Erdbeschleunigung)
H ₂ O bidest.	bidestilliertes Wasser
I	Ionenstärke
IPTG	Isopropylthiogalactosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
K _{EQ}	Gleichgewichtskonstante
KF	Kernfragment
Km	Kanamycin
K _M	Michaelis Menten Konstante
k_{on}	berechnete Geschwindigkeitskonstante [M ⁻¹ s ⁻¹]
k_{obs}	gemessene Geschwindigkeit d. ETs [s ⁻¹]
λ	Wellenlänge
MCS	Multiple Cloning Site

MetOH	Methanol
n. b.	nicht bestimmt
NBT	Nitroblautetrazolium
NCS	newborn calf serum
NMR	Kernspin Magnet Resonanz
OD	Optische Dichte
PAGE	<u>P</u> oly <u>a</u> crylamid <u>G</u> ele <u>e</u> ktropherese
P. d.	Paracoccus denitrificans
PCI	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol
PP	Periplasma
rpm	Umdrehungen pro Minute (r <u>o</u> unds p <u>e</u> r <u>m</u> inute)
RT	Raumtemperatur
SAP	Shrimps Alkaline Phosphatase
SDS	Natriumdodecylsulfat (<u>S</u> odium- <u>d</u> odecyl- <u>s</u> ulphate)
SF	saures Fragment
Tet	Tetracyclin
TM	Transmembran
U	Unit
UE	Untereinheit
ü.N.-Kultur	Übernachtkultur
UZ	Ultrazentrifuge
V	Volt
WT	Wildtyp
WW	Wechselwirkung

9. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn **Prof. Bernd Ludwig** für die Bereitstellung des interessanten Themas und die Möglichkeit diese Arbeit in der Abteilung 'Molekulare Genetik' am Institut für Biochemie durchzuführen. Seine stete Diskussionsbereitschaft waren mir ebenso wertvoll, wie sein Vermögen einen Menschen intrinsisch motivieren zu können. Ebenso danke ich ihm für seine Geduld, Großzügigkeit und Toleranz gegenüber meinen ungewöhnlichen Arbeitszeiten und meinem Multitasking-Leben.

I really thank **Prof. Francesco Malatesta** for all his patience with me and my funny proteins, for the moment in which we saw fast electron transfer between cytochrome c_1 und c_{552} for the first time, for all the cigarettes we smoked in front of the stopped flow, for all the discussions we had and for the way he tried to taught me to be not too german.

Ich danke **Dr. Vladimir Rogov** für die kalorimetrischen Messungen, und die Versuche zur analytischen Gelfiltration, die in der Abteilung Biophysikalische Chemie durchgeführt wurden. Ebenso gilt mein Dank **Dr. Christian Lücke**, der die NMR Messungen des löslichen Fragmentes von Cytochrom c_1 durchführte.

Weiterhin danke ich **Dr. Gottfried Mayer** für die Messungen in der analytischen Ultrazentrifuge und **Michaela Ritter** für die Redoxpotentialmessungen am Institut für Biophysik in Frankfurt.

Ich möchte mich bei Frau **Prof. Linda Thöny-Meyer** von der ETH Zürich für die freundliche Bereitstellung des Hämreifungsvektors pEC 86 bedanken.

Ich danke **Oliver Anderka, Marcus Grimm, Susanne Heintke, Annette Odenwald, Ute Pfitzner, Bettina Pobisch, Maria Rodriguez, Julia Rothenburger, Dr. Krishna Saxena, Dr. Thomas Schröter, Lalan Sinha und Andreas Stocker** für das gute Arbeitsklima.

Ich danke meinen humatrix Kollegen **Matthias Schneider, Jan Wolff, Michael Ruiss** und **Martin Thoma** dafür, dass sie meinen Multitasking-Alltag im Gründungsjahr weitest möglich unterstützten.

Ich danke **Werner Müller** dafür, dass er jeden Morgen neben der BILD-Zeitung auch die Sonne mit ins Institut brachte, ebenso für die unzähligen Zigarettenpausen auf der kleinen Metallbank, und ich danke seiner Frau **Traude Müller** für die täglichen Käsebrote, ohne die ich diese Arbeit nicht hätte durchstehen können.

Ich danke **Andrea Herrmann** und **Andreas Lück** für ihre zuverlässige technische Assistenz.

Ich danke **Dr. Vicky Drosou** zum einen für die Überlassung des Projektes Cytochrom c_1 und die Einarbeitung in die Materie, und zum anderen dafür, dass sie mir in schweren Zeiten näher sein konnte, als ich mir selber.

Ich danke **Jule Janzon** für die böse Musik im Labor, für die späten Abende und langen Wochenenden im Institut, für ihre warme Schulter und ihr immer offenes Ohr.

Ich danke **Oliver Maneg** dafür, dass er es immer schafft das Leben so zu nehmen wie es kommt, für die unvergessliche Zeit in Rom und für seine Fähigkeit zum Synchronstürzen.

Ich danke **Dr. Oliver M. Richter** für seine unermüdliche Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, und dafür, dass er mich lehrte, dass ein negatives Ergebnis auch ein Ergebnis ist

Ich danke **Klaus Hoffmeier** für seine unfassbare Geduld und Gelassenheit im Umgang mit etwaigen computergenerierten Problemen, und ebenso für seine – nicht immer konventionellen – Lösungsansätze zur Behebung eben dieser.

Ich danke **Melanie „petite sœur“ Gruschwitz** dafür, dass sie es immer schafft den Blick zur Sonne freizumachen. *Je t'embrasse.*

Ich danke **Robert Diehl** dafür, dass ich mich immer auf ihn verlassen kann, und dafür, dass er mir beigebracht hat, dass nichts im Leben zufällig passiert.

Ich danke **Nicole Koppai** dafür, dass sie immer für mich da war, wenn ich sie brauchte.

Ich danke **Rebeca Eick doO** dafür, dass es mit ihr heute noch genauso ist wie vor fünfzehn Jahren, und dafür, dass sie es in fünfzehn Jahren auch noch so sein wird.

Ich danke **meinen Eltern** für ihre Unterstützung während meines gesamten Studiums, dafür, dass sie mir beigebracht haben nach vorne zu sehen, und dafür, dass sie mir immer das Gefühl gaben, dass das was ich tue einen Sinn hat.

Und ich danke **Martin Lommel** dafür, dass es ihn in meinem Leben gibt.....*until the seas run dry.....*

10. Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Anna Carina Eichhorn
Geburtstag und -ort	15.06.1972 in Frankfurt am Main
Anschrift	Hessenplatz 4, 60487 Frankfurt am Main
Familienstand	ledig

Schulische Ausbildung

1978 – 1982	Elsa-Brandström-Schule (Grundschule) in Frankfurt am Main
1982 – 1991	Bettinaschule (Gymnasium) in Frankfurt am Main
Jun. 1991	Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife

Dez. 1991 – Jun. 1992	Auslandsaufenthalt in Neuseeland
-----------------------	----------------------------------

Universitäre Ausbildung

WS 1992/93 – SS 1993	Grundstudium der Chemie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main
WS 1993/93 – SS 1995	Grundstudium der Biologie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main
Mär. 1995	Erwerb des Vordiploms in Biologie in den Fächern Botanik, Zoologie, Physik und Organischer Chemie
WS 1995/96	Zwischensemester der Biochemie an der Johann Wolfgang

Goethe-Universität in Frankfurt am Main

Mär. 1996	Zwischenprüfung Biochemie in den Fächern Biochemie, Biophysikalische Chemie und Zellbiologie
SS 1996 – WS 1997/98	Hauptstudium der Biochemie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main
Jul. 1998	Erwerb des Diploms in Biochemie

Wissenschaftlicher Werdegang

Jan. 1998 – Jul. 1998	Anfertigung der Diplomarbeit „Untersuchung zur Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen F-Aktin und Hexokinase durch die Herstellung und Aufreinigung rekombinanter Proteine“ am Institut für Kinematische Zellforschung an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main unter der Betreuung von Prof. Dr. Jürgen Bereiter-Hahn
Nov. 1998 – Dez 1999	Stipendiatin des Graduiertenkollegs „Proteinstruktur, Dynamik und Funktion“ der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main
Jan. 2000 – Mär. 2002	wissenschaftliche Angestellte am Institut für Molekulare Genetik an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main
Nov. 1998 – Feb. 2003	Durchführung der Doktorarbeit mit dem Titel „Konstruktion und funktionelle Charakterisierung löslicher Fragmente des Cytochrom c_1 aus <i>Paracoccus denitrificans</i> “ am Institut für Molekulare Genetik an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main unter der Betreuung von Prof. Dr. Bernd Ludwig
Seit Feb. 2001	Geschäftsführender wissenschaftlicher Vorstand der humatrix Aktiengesellschaft in Frankfurt am Main

Publikationen

Eichhorn, Anna C., Malatesta, Francesco, Janzon, Julia, Ludwig, Bernd, (*Manuskript in Vorbereitung*) Interaction of Cytochrome c_1 with Cytochrome c_{552} from *Paracoccus denitrificans* – pre-steady-state kinetics of soluble fragments.

11. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Frau Anna Carina Eichhorn, geboren am 15.06.1972, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Titel „Konstruktion und funktionelle Charakterisierung löslicher Fragmente des Cytochrom c_1 aus *Paracoccus denitrificans*“ selbstständig angefertigt habe, und mich nicht anderer Quellen oder Hilfsmittel, als die angegebenen bedient habe. Ich habe bisher an keiner anderen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Frankfurt am Main, den 28. Februar 2003

(Anna C. Eichhorn)